

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

3D nahamudeli loomine kasutades detsellulariseeritud naha rakuvälist maatriksit ning selle kasutamine koe taastumist reguleeriva faktori THBS4 mõju uurimiseks.

Magistritöö

30 EAP

Evgeniy Brik

Juhendajad: PhD MD Viljar Jaks

PhD Mariliis Klaas

TARTU 2019

INFOLEHT

3D nahamudeli loomine kasutades detsellulariseeritud naha rakuvälist maatriksit ning selle kasutamine koe taastumist reguleeriva faktori THBS4 mõju uurimiseks.

Nahk on selgroogsete loomade väline kate, mille peamiseks ülesandeks on organite ja kudede kaitse. Nahal on kaks peamist kihti: epidermis, mis koosneb peamiselt keratinotsüütidest ja dermis, mis koosneb peamiselt fibroblastidest ja rakuvälisest maatriksist (RVM).

RVM on rakkudevaheline võrgustik mille peamised ülesanded on tagada kudede vastupidavus koormusele ning reguleerida RVM-iga kokkupuutuvate rakkude käitumist. RVM-i võib jagada basaalmembraaniks, millele ankurduvad epiteelikoe rakud ning interstitsiaalseks maatriksiks, mis on tugiraamistikuks rakkudele mitteepiteeliaalsetes kudedes. Naha kahjustuse korral RVM paraneb regeneratsioonil. Paraku ei saa kõiki kahjustusi parandada, seega tuleb siirdada naha fragmente, et parandamine oleks edukas. Alternatiivina oleks selliste faktorite leidmine, mis aitaks organismil ise sünteesida RVM-i piisavas koguses. Selle magistritöö eesmärkideks olid luua *in vitro* rekonstrueeritud naha mudel ja selgitada trombospondiin 4 mõju rakkude migratsioonile ja adhesioonile kasutades loodud mudelit.

Märksõnad: nahk, haav, regeneratsioon, keratinotsüüdid, fibroblastid, rakuväline maatriks.

CERCS kood: B210 (Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid).

Construction of a 3D skin model using decellularized skin extracellular matrix and its use in investigating the influence of tissue regeneration factor THBS4.

Skin is an external coating of vertebrate animals. Skin functions are protection of organs and tissues. The skin has two main layers: an epidermis which consists mainly of keratinocytes and a dermis which consists mainly of fibroblasts and extracellular matrix (ECM).

ECM is an intercellular network which main function is to ensure tissue resistance to load and to regulate the behavior of cells in contact with ECM. ECM can be divided into a basal membrane and an interstitial matrix. Epithelial cells anchor to basal membrane and non-epithelial cells are located in interstitial matrix. If skin is damaged, it regenerates. Unfortunately, not all the damages can be repaired so the skin fragments must be transplanted so that the repair would be successful. Alternative is to find such factors that would help to synthesize ECM itself in sufficient quantities. The aim of this study were to create an *in vitro* reconstructed skin model and to explain the effect of thrombospondin 4 on cell migration and adhesion using a created model.

Keywords: skin, wound, regeneration, keratinocytes, fibroblasts, extracellular matrix.

CERCS code: B210 (Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture).

SISUKORD

| | |
|--|----|
| INFOLEHT | 2 |
| SISUKORD | 3 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 5 |
| SISSEJUHATUS | 6 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 7 |
| 1.1 Naha üldiseloomustus..... | 7 |
| 1.1.1 Naha histoloogiline ehitus ja naha rakud..... | 8 |
| 1.1.2 Inimese ja hiire naha võrdlus | 11 |
| 1.2 Rakuväline maatriks | 12 |
| 1.3 Naha regeneratsioon | 13 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 16 |
| 2.1 Töö eesmärgid | 16 |
| 2.2 Materjal ja meetoodika..... | 16 |
| 2.2.1 Rakuliinid, kultuurid ja nende kultiveerimine | 16 |
| 2.2.2 Inimese ja hiire nahk..... | 17 |
| 2.2.3 Detsellulariseerimine | 17 |
| 2.2.4 Rakkude kasvatamine detsellulariseeritud nahatükki peal | 18 |
| 2.2.5 Kultiveeritud rakkude immunofluorestsentsanalüüs | 19 |
| 2.2.6 Koelõikude immunofluorestsentsanalüüs | 21 |
| 2.2.7 Konditsioneeritud söötmete valmistamine | 21 |
| 2.2.8 Western blot..... | 22 |
| 2.2.8.1 Konditsioneeritud söötmete proovide ettevalmistamine | 22 |
| 2.2.8.2 Rakku proovide ettevalmistamine | 22 |
| 2.2.8.3 Elektroforees ja valkude ülekande PVDF membraanidele..... | 23 |
| 2.2.8.4 Antikehade seondumine ja töötlemine aluselise fosfataasiga..... | 23 |
| 2.2.9 Statistiline analüüs | 24 |
| 2.3 Tulemused | 24 |
| 2.3.1 HaCaT rakud on integriin $\alpha 6^{+}$ integriin $\beta 4^{+}$ $K 5^{+}$ $K 10^{-}$ VIM^{-} α -SMA $^{+}$ rakud..... | 24 |
| 2.3.2 Inimese dermaalsed fibroblastid ekspresseerivad vimentini ja α -SMA-d..... | 28 |
| 2.3.3 Trüpsiin-Triton X-100-põhise meetodiga saab detsellulariseerida inimese ja hiire nahka..... | 32 |
| 2.3.4 HaCaT rakud kinnituvad kõige paremini detsellulariseeritud inimese papillaarsele dermisele..... | 34 |
| 2.3.5 Inimese dermaalsed fibroblastid proliferuuvad kõige paremini detsellulariseeritud inimese retikulaarse dermise sees | 36 |
| 2.3.6 THBS4 suurendab inimese dermaalsete fibroblastide invasiooni detsellulariseeritud inimese nahka | 38 |
| 2.4 Arutelu | 42 |

| | |
|---------------------------|----|
| KOKKUVÕTE | 44 |
| SUMMARY | 45 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 47 |
| LIHTLITSENS | 53 |

KASUTATUD LÜHENDID

AP – aluseline fosfataas (ingl. *alkaline phosphatase*)

BCA – bitsinkoonhape (ingl. *bicinchoninic acid*)

BCIP – 5-bromo-4-klooro-3-indolüülfosfaat (ingl. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*)

BSA – veise seerumi albumiin (ingl. *bovine serum albumin*)

CD – diferentseerumise klaster (ingl. *cluster of differentiation*)

Cy5 – tsüaniin 5 (ingl. *cyanine 5*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool (ingl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DMEM – Dulbecco muudetud Eagle sööde (ingl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

EDTA – etüleendiaminotetraädikhape

FBS – veise loote seerum (ingl. *fetal bovine serum*)

ITS – insuliini, transferriini ja seleeni lahus

K – keratiin

NBT – nitro sinine tetrasooliumkloriid (ingl. *nitro blue tetrazolium chloride*)

NP-40 – Nonidet P-40, mitteioonne detergent

PBS – fosfaat-puhverdatud soolalahus (ingl. *phosphate-buffered saline*)

PE – fukoerütriin (ingl. *phycoerythrin*)

Pen-Strep – penitsilliini ja streptomütsiini lahus

PFA – paraformaldehüüd

PVDF – polüvinülideenfluoriid (ingl. *polyvinylidene fluoride*)

RVM – rakuväline maatriks

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (ingl. *sodium dodecyl sulphate*)

THBS4 – trombospondiin 4 (ingl. *thrombospondin 4*)

α -SMA – α silelihase aktiin (ingl. *α smooth muscle actin*)

SISSEJUHATUS

Nahk on selgroogsetele loomadele ja inimestele iseloomulik organismi väline kate, mille peamiseks ülesanneks on kõikide organite ja kudede kaitse. Nahk on oma massilt kehas neljas organsüsteem pärast rasvkudet, skeletti ja lihassüsteemi. Naha terviklikkus peab olema hästi tagatud ja seetõttu nahk peab olema võimalikult vastupidav. Naha vastupidavuse kindlustab selle mitmekihiline struktuur. Naha koelõigul on selgelt eristatavad kaks peamist kihti: pindmine kiht ehk epidermis ja alumine kiht ehk dermis ning epidermise ja dermise vahel paikneb basaalmembraan.

Epidermis ehk marrasknahk on naha ülemine osa, mis koosneb mitmekihilisest lameepiteelist. Epidermise mitmekihiline lameepiteel sisaldab mitut tüüpi rakke. Ligikaudu 90 kuni 95% epidermise rakkudest on keratinotsüüdid ehk keratiinid sünteesivad rakud. Keratiinid ehk tsütokeratiinid on struktuursete valkude perekond, mis muudab rakkude tsütoskeleti tugevamaks, mis tagab naha välise kihi vastupidavuse.

Dermis on naha alumine osa, mis koosneb kahest omavahel tugevalt seotud kihist. Dermis koosneb peamiselt rakuvälisest maatriksist ehk RVM-ist, mille sees paiknevad üksikud rakud - dermaalsed fibroblastid.

Kuigi nahk on üsna vastupidav organsüsteem, siiski mõnikord toimuvad naha kahjustused ning neid tuleb parandada mehanismiga, mida nimetatakse regeneratsiooniks. Kui kahjustus on liiga suur, siis nahk ei suuda regeneratsiooni abil iseennast parandada ja seega tuleb siirdada kahjustatud piirkonnale normaalse naha fragmente, et parandamine oleks edukas. Alternatiivina oleks selliste faktorite leidmine, mis aitaks organismil ise sünteesida RVM-i piisavas koguses. Selleks on vaja usaldusväärne ja mugav mudel. Seetõttu käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli luua *in vitro* rekonstrueeritud naha mudel kasutades detsellulariseeritud naha fragmente ja immortaliseerunud HaCaT keratinotsüüte ning inimese dermaalseid fibroblaste. Teiseks eesmärgiks oli selgitada ühe potentsiaalse regeneratsiooni soodustava RVM-i faktori trombospondiin 4 mõju rakkude migratsioonile ja adhesioonile kasutades eelnevalt loodud mudelit.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Naha üldiseloomustus

Nahk on selgroogsetele loomadele ja inimestele iseloomulik organismi väline kate, mille peamiseks ülesanneks on kõikide organite ja kudede kaitse. Naha teisteks tähtsateks ülesanneteks on keha soojusregulatsioon ja funktsioneerimine meeleelundina (Gray ja Lewis, 1918; Watt, 2014). Nahk on oma massilt kehas neljas organsüsteem pärast rasvkudet, skeletti ja lihassüsteemi. Leiti, et 70 kg massiga mehe nahk kaalub keskmiselt 3,86 kg ehk ta moodustab ligikaudu 5,5% kogu keha massist (Goldsmith, 1990).

Naha terviklikkus peab olema hästi tagatud ja seetõttu nahk peab olema võimalikult vastupidav. Naha vastupidavuse kindlustab selle mitmekihiline struktuur. Naha koelõigul on selgelt eristatavad kaks peamist kihti: pindmine kiht ehk epidermis (kr. *epi* – üle ja *derma* – nahk) ja alumine kiht ehk dermis ning epidermise ja dermise vahel paikneb basaalmembraan (joonis 1) (Gray ja Lewis, 1918; Watt, 2014; Haskell jt., 2016). Dermise all paikneb rasvarikas sidekude, mida nimetatakse hüpodermiseks. Hüpodermis ei kuulu naha koosseisu ja seal paiknevad arterid, veenid ja närvikiud, mis ulatuvad dermise ülemise osani. Veresooni on vaja toitainete transportimiseks pidevalt uueneva naha rakkudele, närvikiud vastutavad erinevatest retseptoritest saadud signaalide ülekandmise eest. Näiteks, dermise ja hüpodermise vahel paiknevad Pacini kehakesed, mis on seondunud närvilõpmetega ja mis vastutab vibratsiooni tundlikkuse eest (Dario jt., 2003; Haskell jt., 2016).

Puutetundlikkus on võime kindlaks teha eseme kuju, pinnastruktuuri ja suurust puudutamise teel. Puutetundlikkuse eest vastutavad kompimiskehakesed, Ruffini kehakesed ja Merkel'i rakud (Halata ja Munger, 1981; Dario jt., 2003; Watt, 2014; Haskell jt., 2016). Kompimiskehakesed paiknevad dermises basaalmembraani lähedal (joonis 1) (Gray ja Lewis, 1918; Dario jt., 2003; Haskell jt., 2016). Ruffini kehakesed vastutavad naha venitustundlikkuse eest ning nad paiknevad dermises (Halata ja Munger, 1981; Fitzpatrick jt., 2004). Merkeli rakud vahendavad samuti osa puutetundlikkust, kuid nende osakaal kompimisemees on palju vähem võrreldes teiste kompimiskehakestega kuna Merkeli rakud paiknevad nahas väga hõredalt (Haskell jt., 2016). Valutundlikkuse eest vastutavad aga vabad närvilõpmed, mis paiknevad dermise ülemises osas (joonis 1) (Price ja Dubner, 1977; Dario jt., 2003).

Imetajad on püsisoojased – neil on võime hoida konstantset kehatemperatuuri keskkonna temperatuurist sõltumatuna. Inimese keha normaalse temperatuuri säilitamist juhivad kesknärvisüsteem ja endokriinsüsteem (Robertshaw, 1977). Soojatunnetuse eest vastutavad

samuti vabad närvilõpmed, mis paiknevad dermise ülemises osas (joonis 1) (Caterina jt., 1997; McKemy jt., 2002; Dario jt., 2003). Närvi ja endokriinsüsteem kontrollivad higinäärmeid, mis aitavad säilitada kehatemperatuuri liiga kõrge ümbritseva temperatuuriga keskkonnas (Robertshaw, 1977). Higinääre (ingl. *sweat gland*) paikneb dermise ja hüpodermise piirpinnal, selle juha ulatub läbi dermise ja epidermise ning lõpeb avaga epidermise välispinnal (joonis 1) (Gray ja Lewis, 1918; Haskell jt., 2016).

Naha pealmise kihi terviklikkuse tagamiseks peab see olema pidevalt kaetud rasuga. Rasu toodetakse rasunäärmete poolt, mis paiknevad dermises (joonis 1) (Gray ja Lewis, 1918; Haskell jt., 2016). Rasunäärmete juhad lõpevad harilikult karvafolliikulites, aga mõnel juhul, näiteks näol, välimistel kõrvadel, peopesadel ja jalataldadel avanevad juhad ka epidermise välispinnal (Gray ja Lewis, 1918; Haskell jt., 2016).

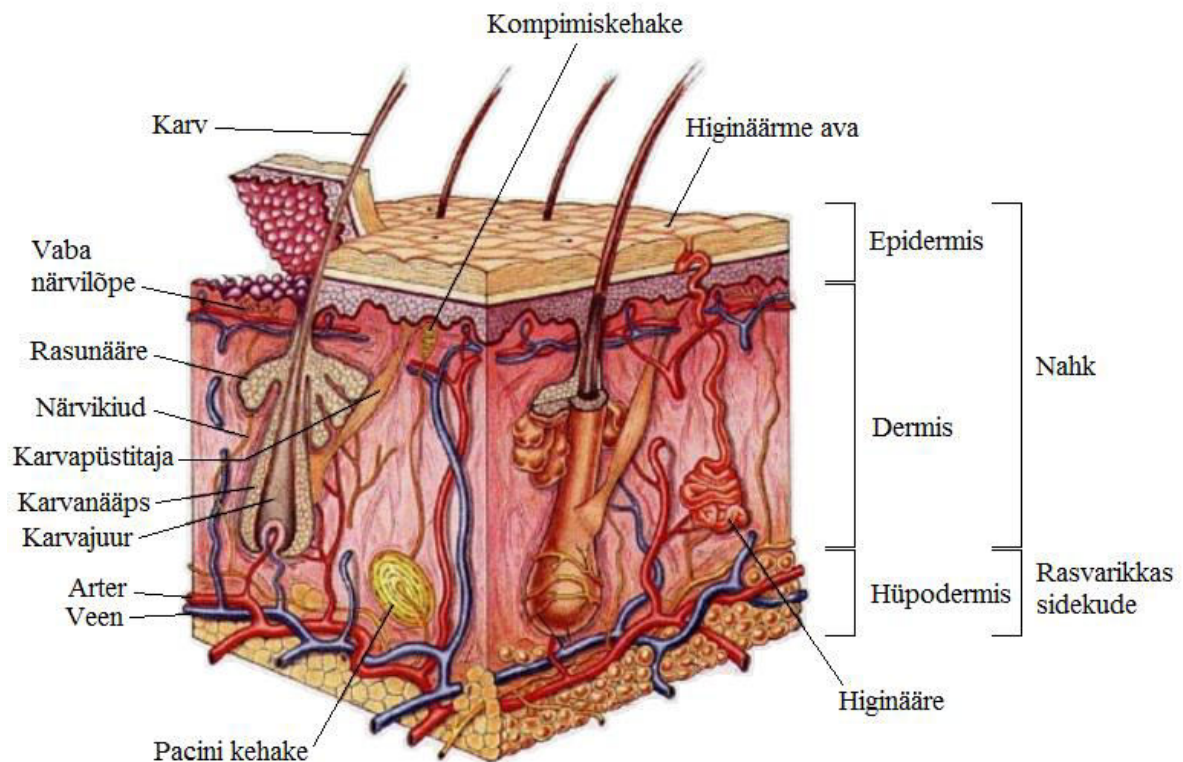
Karvastik katab imetajate, sealhulgas inimeste keha pinda. Karv koosneb karvajuurest ja karvast (joonis 1) (Gray ja Lewis, 1918; Haskell jt., 2016). Karvajuur asub lõpeb karvasibulas, mis paikneb karvanääpsu ehk karvafolliikuli alaosas (joonis 1). Karvasibul sisaldab intensiivselt jagunevaid keratinotsüüte ja pigmenti toodavaid melanotsüüte ning mida toetab veresooni sisaldav karvanäsa (Gray ja Lewis, 1918; Haskell jt., 2016). Iga karvanääpsu külge on seondunud väike silelihas, mida nimetatakse karvapüstitaja lihaseks (joonis 1), mis tõstab külma või hirmu korral karva püsti (Gray ja Lewis, 1918; Watt, 2014; Haskell jt., 2016).

1.1.1 Naha histoloogiline ehitus ja naha rakud

Epidermis ehk marrasknahk on naha ülemine osa, mis koosneb mitmekihilisest lameepiteelist. Epidermise paksus erinevates keha piirkondades varieerub 60 – 400 µm-ni (Oltulu jt., 2018; Sandby-Møller jt., 2003). Epidermise paksus samuti sõltub soost ja rahvusest. Leiti, et epidermis on paksem meestel ning Aasia päritoluga inimestel (Oltulu jt., 2018; Sandby-Møller jt., 2003). Epidermis (paksemas osas) koosneb viiest kihist (liikudes sisemisest kihist välimise suunas):

1. *stratum basale* ehk baaskiht;
2. *stratum spinosum* ehk ogakiht;
3. *stratum granulosum* ehk sõmerkiht;
4. *stratum lucidum* ehk läikekiht;
5. *stratum corneum* ehk sarvkiht (Reintam jt., 2012).

Paksem epidermis esineb peopesadel ja jalataldadel, ülejäänud keha on kaetud õhema epidermisega, kus puudub *stratum lucidum* (Gray ja Lewis, 1918; Haskell jt., 2016).



Joonis 1. Naha ehitus. Naha lõigus on selgelt eristatavad kaks kihti: ülemine kiht ehk epidermis ja alumine kiht ehk dermis. Dermis on seondunud rasvarikka sidekoega, mis ei kuulu naha koosseisu ja mida nimetatakse hüpodermiseks. Joonisel on veel näidatud higinäärre, rasunäärre, karv koos karvapüstitajaga, vaba närvilõpe ja kompimiskehake mis paiknevad dermises; Pacini kehake, mis paikneb dermise ja hüpodermise vahel ning arter, veen ja närvikiud, mis paiknevad peamiselt hüpodermises. Joonis on muudetud Dario jt., 2003 järgi.

Epidermise mitmekihiline lameepiteel sisaldab mitut tüüpi rakke. Ligikaudu 90 kuni 95% epidermise rakkudest on keratinotsüüdid ehk keratiinid sünteesivad rakud (McGrath jt., 2004; Morton ja Crawley, 2018). Keratiinid ehk tsütokeratiinid on struktuursete valkude perekond, mis muudab rakkude tsütoskeleti tugevamaks, mis tagab naha välise kihi vastupidavuse (Franke jt., 1981; Schweizer jt., 2006; Borowiec jt., 2013; Morton ja Crawley, 2018). Ülejäänud 5 kuni 10% epidermise rakkudest on melanotsüüdid, Merkeli rakud ja Langerhans'i rakud. Melanotsüüdid on rakud mis sünteesivad pigment melaniini ning seejärel transpordivad selle keratinotsüütidesse. Melaniin on oluline rakkude kaitsmiseks UV kiirguse eest (Haskell jt., 2016; Morton ja Crawley, 2018). Langerhans'i rakud on antigeeni presenteeritavad immuunsüsteemi rakud, mis migreeruvad lümfisüsteemist epidermisesse ning tagasi (Haskell jt., 2016).

Stratum basale on epidermise kõige alumine kiht, mis on seondunud basaalmembraanile. See kiht on moodustunud ühekihilisest kuubikujulistest keratinotsüütidest ja selles kihis paiknevad rakud on kõrge kasvukiirusega ning mitootiliselt aktiivsed, mis tagab naha epidermise pideva uuenemise. Basaalkihis paiknevad noored keratinotsüüdid, mis ekspresseerivad keratiinid 5 ja 14 (K5 ja K14) (Fuchs ja Green, 1980; Moll jt., 1982; Borowiec jt., 2013). Selles kihis samuti paiknevad melanotsüüdid ja Merkel'i rakud (Haskell jt., 2016; Morton ja Crawley, 2018).

Stratum spinosum on epidermise teine kiht. See kiht sai nime ogaliste struktuuride järgi, mis on moodustunud kompaktselt pakitud üksteisega tugevalt seotud keratinotsüütidest, mis ekspresseerivad K1 ja K10 (Fuchs ja Green, 1980; Moll jt., 1982; Borowiec jt., 2013).

Stratum spinosum sisaldab peale keratinotsüütide ka Langerhans'i rakke (Haskell jt., 2016).

Stratum granulosum on kolmas kiht, mis on moodustunud keratohüaliini graanuleid sisaldavatest keratinotsüütidest. Selles kihis paiknevad keratinotsüüdid ekspresseerivad K1 ja K10 (Fuchs ja Green, 1980; Moll jt., 1982; Borowiec jt., 2013). Keratohüaliini graanulid on hästi eristatavad tavalises valgusmikroskoobis. *Stratum granulosum* kihis toimub keratinotsüütide programmeeritud surm kus nad muutuvad korneotsüütideks (Haskell jt., 2016).

Stratum lucidum on peopesade ja jalataldade spetsiifiline epidermise kiht, mis sisaldab värskid korneotsüüte ja lipiide. On tõenäoline, et see kiht tagab peopesa ja jalatallanaha suurema vastupidavuse, kuna neile piirkondadele rakendatakse suuremat koormust kui muudele nahapiirkondadele (Gray ja Lewis, 1918; Haskell jt., 2016).

Stratum corneum on välimine epidermise kiht, mis koosneb korneotsüütidest. Aeg-ajalt tulevad korneotsüüdid nahapinnalt lahti, mis tagab naha pideva uuendamise (Gray ja Lewis, 1918; Haskell jt., 2016).

Lisaks keratiinidele ekspresseerivad keratinotsüüdid integriine, mis vahendavad rakk-rakk ja rakk-maatriks sidemete moodustamist. Näiteks basaalmembraanile seondumiseks hemidesmosoomide abil on oluline integriin $\alpha 6\beta 4$ (Carter jt., 1990; Stepp jt., 1990; Sonnenberg jt., 1991).

Dermis on naha alumine osa, mis koosneb kahest omavahel tugevalt seotud kihist. Dermise ülemist kihti nimetatakse papillaarseks dermiseks ja alumine kiht nimetatakse retikulaarseks dermiseks (Brown, 1972; Watt, 2014; Haskell jt., 2016). Dermise paksus varieerub erinevates keha piirkondades vahemikus 3 mm kuni 9 mm (Oltulu jt., 2018). Nii papillaarne kui ka retikulaarne dermis koosnevad peamiselt rakuvälisest maatriksist ehk RVM-ist, mille sees paiknevad üksikud rakud (Brown, 1972; Haskell jt., 2016).

Papillaarse dermise ülaosa piirneb basaalmembraaniga. Papillaarse dermise kontaktpinnal basaalmembraaniga on dermise väljavõlmuvused, mida nimetatakse papillideks (Gray ja Lewis, 1918). Papillaarses dermises paiknevad kompimiskehakesed ja vabad närvilõpmed (Gray ja Lewis, 1918; Dario jt., 2003; Haskell jt., 2016). Papillaarse dermise RVM-i kiud on peened (diameeter on 0,3 – 3 µm) ning nende orientatsioon on juhuslik (Brown, 1972).

Retikulaarne dermis on seondunud rasvarikka hüpodermisega. Retikulaarses dermises paiknevad Ruffini kehakesed (Gray ja Lewis, 1918; Dario jt., 2003; Haskell jt., 2016). Retikulaarse dermise RVM-i valkude kiud on jämedad (diameeter 10 – 40 µm), ning nende orientatsioon on korrapärasem. Moodustub laineline kimpude süsteem, mis annab nahale elastsuse. Erandina on RVM-i valkude kiud orienteeritud kontsentriselt ümber juuksekarva (Brown, 1972).

Dermise RVM valgud on sünteesitud dermaalsete fibroblastide poolt, mis paiknevad kogu dermise paksuses (Lichtenstein jt., 1975; Ghetti jt., 2018). Dermises paiknevad fibroblastid ekspresseerivad α -SMA ja vimentini (Goodpaster; Hsia jt., 2016). On leitud, et retikulaarsest dermisest saadud fibroblastid proliferuuvad *in vitro* keskmiselt 24,6% aeglasemalt võrreldes papillaarsest dermisest saadud fibroblastidega (Harper ja Grove, 1979). Lisaks sellele näidati, et need fibroblastide subpopulatsioonid sünteesivad erinevaid RVM valke (Ghetti jt., 2018). Peale fibroblastidele paiknevad dermises närvikiud, immuunsüsteemi rakud (makrofaagid, nuumrakud ja dendriitrakud), karvanääpsud ja higi- ning rasunäärmete dermaalsed osad (Gray ja Lewis, 1918; Salmon jt., 1994; Haskell jt., 2016).

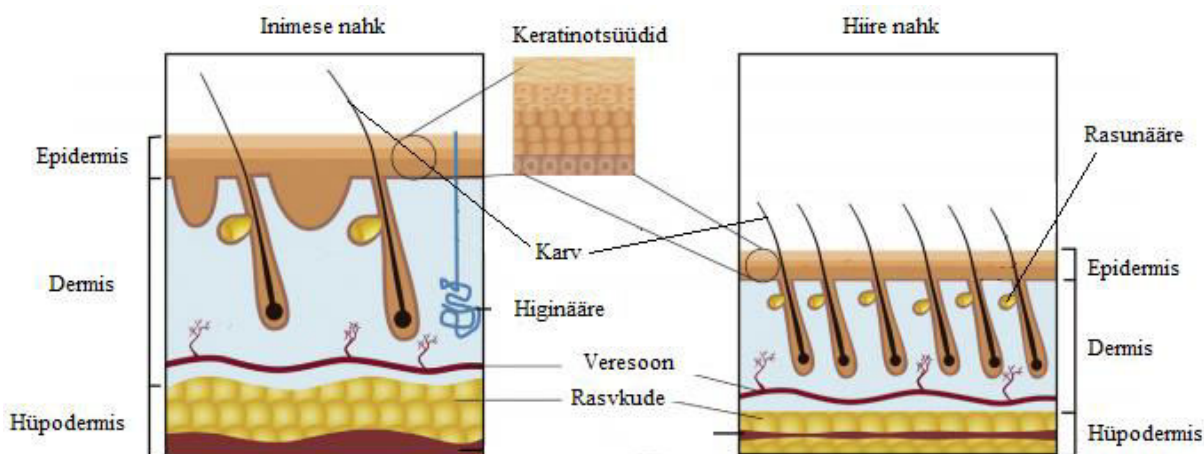
1.1.2 Inimese ja hiire naha võrdlus

Inimene (*Homo sapiens*) ja hiir (*Mus musculus*) on imetajad, mis on sarnased nii füsioloogia kui ka biokeemia seisukohast. Hiir on hea mudelorganism, kuna hiire nahk sarnaneb ehituslikult inimese nahaga kuna samuti koosneb epidermisest ja dermisest (joonis 2). Teiseks, hiire ja inimese dermise RVM-ide struktuurid on omavahel sarnased (O'Brien jt., 2014). Kolmandaks hiire nahas leiduvad samad rakutüübid mis inimese nahas (Zomer ja Trentin, 2018).

Vaatamata sellele on hiire nahal mitu erinevust inimese nahast. Esiteks on hiire nahk palju õhem võrreldes inimese nahaga: hiire epidermise paksus (ilma *stratum corneum* kihita) on 22 µm, *stratum corneum*'i paksus on 6 µm ja dermise paksus on 230 µm (inimese epidermise paksus on 60 – 400 µm ja dermise paksus 3 mm kuni 9 mm) (Wei jt., 2017; Oltulu jt., 2018; Sandby-Møller jt., 2003). Teiseks, normaalses hiire nahas ei moodustu dermaalseid papille ning basaalmembraan on siledam (joonis 2) (O'Brien jt., 2014; Zomer ja Trentin, 2018).

Kolmandaks, hiire nahas tekib vigastuse järgselt kontraktsioon, mille viib läbi *panniculus carnosus* - silelihas, mis paikneb hüpodermises (joonis 2) (Zomer ja Trentin, 2018). Inimese organismis *panniculus carnosus* puudub, seega nahadefekti tekkel käigus võib see pigem laieneda (O'Brien jt., 2014).

Mõnikord kasutatakse hiire asemel mudelorganismina siga sest sea nahk on ligikaudu sama paks kui inimese nahk ja sea hüpodermises puudub *panniculus carnosus* (O'Brien jt., 2014). Teisalt on hiirte kasvatamine odavam kui teiste imetajate pidamine ning tänu transgeensele tehnoloogiale on loodud palju geneetiliselt modifitseeritud hiireliine. Lisaks sellele on hiirtel palju rohkem uuritud erinevate bioloogiliste protsesside molekulaarseid mehhanisme kui sigadel (Zomer ja Trentin, 2018). See kõik teeb hiire palju mugavamaks mudelorganismiks imetajate naha uurimisel.



Joonis 2. Inimese ja hiire naha ehitus. Joonisel on skemaatiliselt näidatud higinääre, rasunäärmed, karvad, veresooned, rasvkude. Hiire naha all on *panniculus carnosus*, mis inimestel puudub. Joonis on muudetud Zomer ja Trentin, 2018 järgi.

1.2 Rakuväline maatriks

Rakuväline maatriks (RVM) on rakkudevaheline võrgustik mis koosneb valkude ja polüsahhariidide molekulidest (Theocharis jt., 2016). Maatriksit moodustavad molekulid sekreteeritakse koos asetsevate rakkude poolt. RVM-i ülesanded on: toimida rakkudele tugiraamistikuna ning tagada kudede vastupidavus mehaanilisele koormusele ning reguleerida RVM-iga kokkupuutuvate rakkude kasvu, migratsiooni ja diferentseerumist (Theocharis jt., 2016). RVM-i võib jagada kaheks osaks, mis erinevad teineteisest koostise ja ehituse osas: basaalmembraaniks ning interstitsiaalseks maatriksiks. Basaalmembraan on kilejas struktuur,

millele ankurduvad epiteelikoe rakud. Interstitsiaalne maatriks on tugiraamistikuks rakkudele mitteepiteeliaalsetes kudedes (Theocharis jt., 2016).

RVM-i valgud võib jagada kaheks rühmaks: lahustamatu ehk struktuursed valgud ja lahustatud ehk reguleeritud valgud. RVM-i peamised struktuursed valgud on kollageenid, elastiin, fibronktiin ja laminiinid. Proteoomika andmete põhjal tehtud bioinformaatilise analüüsiga näidati, et inimese RVM moodustumisel osaleb 357 erinevat valku, millest paljud on veel teadmata funktsiooniga (Cromar jt., 2012).

Naha basaalmembraan koosneb peamiselt tüüp IV kollageenist, laminin-332, laminin-511, nidogen-1, nidogen-2 ja perlekaanist (Kefalides, 1971; Hasegawa jt., 2007; Behrens jt., 2012). Tüüp IV kollageen ja laminiinid moodustavad koos nidogeenide molekulidega eraldi võrgustiku, mis on seotud omavahel perlekaani molekulidega (Behrens jt., 2012). Lisaks paiknevad naha basaalmembraanis fibrilliin-1, tüüp V kollageen ja ECM1 (Tiedemann jt., 2005; Sercu jt., 2008; Bonod-Bidaud jt., 2012).

Naha interstitsiaalse maatriksi koostises on peamiselt kollageenid (ligikaudu 80% dermise kuivkaalust) ning elastiin (meestel 6% dermise kuivkaalust ja naistel 5% dermise kuivkaalust) (Weinstein ja Boucek, 1960). Suurem osa kollageenidest on tüüp I kollageen ja tüüp III kollageenid (Sykes, Sokolov, Mikesht jt., 2013). Naha interstitsiaalse maatriksi teiseks oluliseks komponendiks on fibronktiin, mis osaleb dermise RVM-i valkude kokkupakkimisel võrgustikuks (Sottile). Lisaks leidub naha interstitsiaalses maatriksis ka teisi struktuurseid valke, näiteks dekoriin, lumikaan ja periostiin (Mikesht jt., 2013).

RVM-is sisalduvad lisaks glükoosaminoglükaanid, mis on seotud kovalentselt valkudele moodustades proteoglükaane.

RVM-i funktsioonides on olulised reguleeritud valgud. Näiteks, meie töörühmas leiti, et maksakahjustuse korral toimub maksa RVM-i komponentide ARMCX2, olfaktomediin 4 (OLFM4) ja trombospondiin 4 (THBS4) ülekspressioon ja sellega kaasnevad muutused rakkude prolifererumises (Klaas jt., 2016). Lisaks sellele näidati, et THBS4 *knock-out* hiirtel nahakahjustuste paranemine on aeglustunud (Muppala jt., 2015). Sama uurimisrühm näitas, et THBS4 on oluline angiogeneesi toimumiseks nahas (Muppala jt., 2015). Leiti, et THBS4 interakteerub spetsiifiliselt kollageenidega ja mitmete muude RVM-i valkudega (Narouz-Ott jt., 2000).

1.3 Naha regeneratsioon

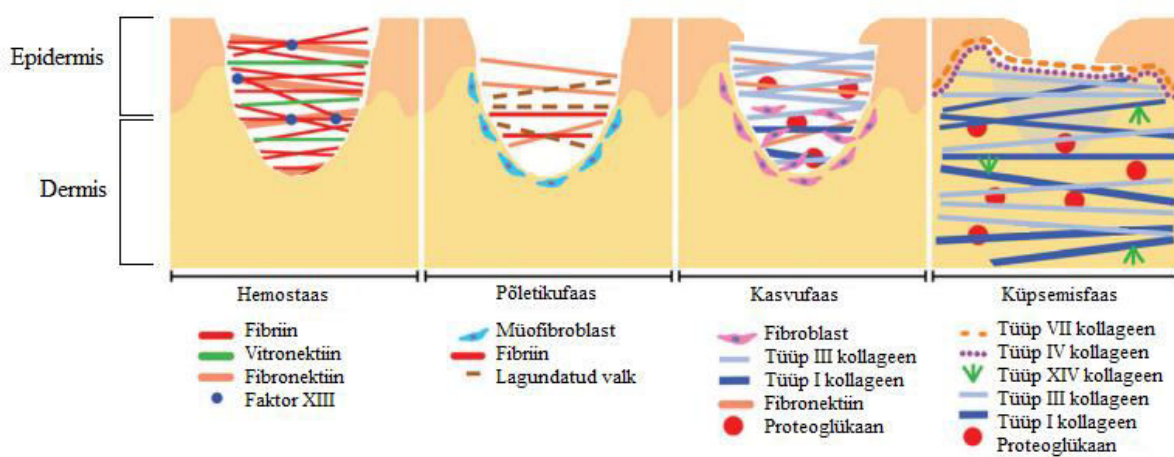
Kõige sagedamini juhtuvate naha kahjustuste ehk haavade paranemisel võib eristada 4 faasi: hemostaas, põletikufaas, kasvufaas ja küpsemisfaas (joonis 3) (Tracy jt., 2016).

Hemostaasis toimub verejooksu peatamine sellega, et haava piirkond kaetakse kiiresti fibrini, vitronektiini, fibronekiini ja faktor XIII valkudega (joonis 3). Lahustamatu fibrin saadakse lahustuva fibrinogeeni ensümaatilisel protsessimisel (Tracy jt., 2016).

Põletikufaasis puhastatakse haavapiirkond bakteritest. Siin mängivad peamist rolli makrofaagid, kuid on leitud et siin on olulised ka vereliistakud ja fibroblastid, mis reguleerivad teineteist mitmete signaalimolekulidega, näiteks TGF- β , interleukiin-1 ja PDGF (Singer ja Clark, 1999). Fibroblastide alampopulatsioon müofibroblastid vastutavad haava piirkonda kokkutõmbe eest (joonis 3) (Tracy jt., 2016).

Kasvufaasis toimub fibroblastide migreerumine selle ajutise RVM-i sisse et hiljem remodelleerida seda. See koosneb tüüp I ja tüüp III kollageenidest, fibronekiinist ning mitmetest proteoglükaanidest (joonis 3) (Tracy jt., 2016). Samal ajal algab reepiteliseerumine ehk keratinotsüütide migreerumine haava piirkonda (Singer ja Clark, 1999).

Küpsemisfaasis toimub RVM-i remodelleerimine, mis muudab seda vastupidavamaks. Lisatakse tüüp XIV kollageen, sünteesitakse basaalmembraani põhiline tüüp IV kollageen ja lisaks veel tüüp VII kollageen (joonis 3) (Tracy jt., 2016).



Joonis 3. Haava paranemise faasid. Paranemisel võib eristada 4 faasi: hemostaas, põletikufaas, kasvufaas ja küpsemisfaas. Hemostaasis toimub verejooksu peatamine. Põletikufaasis toimub haava puhastamine (joonise lihtsustamiseks immuunsüsteemirakud ei ole näidatud). Kasvufaasis toimub ajutise RVM-i süntees ning küpsemisfaasis toimub RVM-i tugevdamine remodelleerimise teel. Epidermis ja dermis on näidatud joontega. Joonis on muudetud Tracy jt., 2016 järgi.

On näidatud, et keratinotsüütidel on *in vitro* piiratud paljunemisvõime kuna rohkem kui 99% rakujagunemistest toimub kõigest 48 tunni jooksul peale külvamist (Roshan jt., 2016). Nii *in vitro* kui *in vivo* järgneb intensiivsele keratinotsüütide jagunemisele programmeeritud surm.

Keratinotsüütide puhul ei tähenda see klassikalist olukorras apoptoosi. Kui apoptoosi käigus rakud fragmenteeruvad ja tekkinud rakkude jäägid eemaldatakse, siis keratinotsüüdid kaotavad tuumasid ning muutuvad *stratum corneum* „rakkudeks“ mida nimetatakse korneotsüütideks (Gray ja Lewis, 1918; Kerr jt., 1972; Haskell jt., 2016). Inimese naha epidermise osa rekonstrueerimisel on olulised vaid keratinotsüüdid kuna nad moodustavad enamuse epidermise rakkude populatsioonist ning sisaldavad keratiine, mis annavad nahale vastupidavuse (Reijnders jt., 2015). Inimese naha rekonstrueerimise raskus seisneb keratinotsüütide piiratud paljunemisvõimel, seega teaduslikel eesmärkidel ei ole mõistlik rekonstrueerida inimese naha tavaliste keratinotsüütidega. Alternatiivina võib kasutada selleks immortaliseerunud keratinotsüütide liine nagu näiteks N/TERT-1 rakud või HaCaT rakud (Dickson jt., 2000; Reijnders jt., 2015; Boukamp jt., 1988; Schoop jt., 1999). HaCaT rakud ekspresseerivad vähediferentseerunud olekus K5 ning ei ekspresseeri K10 (Borowiec jt., 2013). On teada, et HaCaT rakud ekspresseerivad integriini $\alpha 5\beta 1$ ja ei ekspresseeri integriini $\alpha 4\beta 1$ (Koivisto jt., 1999).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö põhieesmärk oli selgitada RVM komponendi THBS4 mõju dermaalsete fibroblastide ja HaCaT rakkude proliferatsioonile kasutades selleks detsellulariseeritud naha maatriksil põhinevat kolmemõõtmelist mudelit.

Töö eesmärkideks olid:

1. luua *in vitro* rekonstrueeritud naha mudel kasutades normaalset inimese ja hiire naha maatriksit ja immortaliseerunud keratinotsüüte ning fibroblaste;
2. katsetada eelnevalt identifitseeritud regulatiivse rakuvälise maatriksi valku (THBS4) mõju rakkude jagunemisele ning migratsioonile kasutades loodud rakuvälist maatriksit.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Rakuliinid, kultuurid ja nende kultiveerimine

Töös kasutatud rakuliinid ja kultuurid on toodud tabelis 1. Kasutatud söötmed on toodud tabelis 2.

Enne katsete tegemist rakke kasvatati söötmes A (89% fenoolpunasega DMEM, 10% FBS ja 1% Pen-Strep lahust). Antibiootikumite lõppkontsentratsioonid kõikides söötmetes on järgmised: penitsilliini 100 U/ml ja streptomütsiini 0,1 mg/ml. Rakke kasvatati inkubaatoris temperatuuril 37°C ja milles oli 5% CO₂.

Tabel 1. Töös kasutatud rakuliinid ja kultuurid.

| Rakuliin või kultuur | Lühikirjeldus | Päritolu |
|---------------------------------|--|---------------------------------|
| HaCaT rakud | Immortaliseerunud aneuploidsed keratinotsüüdid (Boukamp jt., 1988) | Inimene (<i>Homo sapiens</i>) |
| H1299 rakud | Kopsuvähi rakud (Giaccone jt., 1992) | Inimene (<i>Homo sapiens</i>) |
| Inimese dermaalsed fibroblastid | Primaarsed rakud | Inimene (<i>Homo sapiens</i>) |

Tabel 2. Töös kasutatud söötmed.

| Sööde | Söötme koostis | Komponentide tootjad ja katalooginumbrid |
|-------|--|--|
| A | 89% DMEM (fenoolpunasega) 10% FBS 1% Pen-Strep lahust | <i>Gibco (Thermo Fisher)</i> , 41965-039 <i>Corning</i> , 35-079-CV <i>Corning</i> , 30-002-CI |
| B | 89% DMEM (ilma fenoolpunaseta) 10% FBS 1% Pen-Strep lahust | <i>Gibco (Thermo Fisher)</i> , 21063-029 <i>Corning</i> , 35-079-CV <i>Corning</i> , 30-002-CI |
| C | 98% DMEM (ilma fenoolpunaseta) 1% 100× ITS 1% Pen-Strep lahust | <i>Gibco (Thermo Fisher)</i> , 21063-029 <i>Gibco (Thermo Fisher)</i> , 41400-045 <i>Corning</i> , 30-002-CI |

2.2.2 Inimese ja hiire nahk

Inimese naha fragmendid sünnimärkide eemaldamisel jäävatest liigsetest nahaosadest saadi SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Nahahaiguste kliinikust, prof. Külli Kingo uurimisgrupi käest. Hiire naha fragmendid eemaldati meie grupis toimuvate paralleelsete projektide käigus eutaneeritud hiirte nahast.

Naha fragmendid külmutati fikseerimata vedelas lämmastikus ning hoiustati -80°C külmikus kuni kasutamiseni.

Käesolevas töös kasutati CBA liini hiiri. Hiiri hoiustati ja paaritati Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia instituudi vivaariumis, kus õhutemperatuur oli $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 tunnine valguse/pimeduse tsüklil ning vaba juurdepääs toidule ja joogiveele. Antud töö juhendajad, kes on läbinud katselooma koolituse ning omavad loomkatsete tegemiseks ettenähtud tunnistusi, mis on kooskõlas Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivi 2010/63/EL nõuetega, viisid läbi kõik operatsioonid hiire nahatükide saamiseks.

2.2.3 Detsellulariseerimine

Naha fragmentide detsellulariseerimiseks kasutati varasemalt kirjeldatud meetodit modifitseeritud kujul (Morris jt., 2016).

1. päev.

Külmutatud inimese või hiire nahatükk (algne pindala on ligikaudu 100 kuni 150 mm²) sulatati toatemperatuuril. Siis eemaldati karvad ning *stratum corneum* nahatükki õrnalt skalpelliga (*B. Braun, Cat. No. BB510*) epidermaalselt poolt kraapides. Peale seda nahatükk

lõigati väiksemateks nahatükkideks pindalaga ligikaudu 6 kuni 8 mm². Seejärel inkubeeriti nahatükke 6 tundi 1 ml lahuses A (0,25% trüpsiin, 0,1% EDTA) pidevalt loksutades segajal (*Biosan Cat. No. RS-24 Mini-Rotator*). Pärast seda detsellulariseeritavad nahatükid pesti 3 korda 15 minutit 1 ml milli-Q veega samal segajal toatemperatuuril. Järgmisena inkubeeriti nahatüke 1 ml 70% etanoolis samal segajal üleöö toatemperatuuril.

2. päev.

Järgnevad etapid teostati steriilselt koekultuuri laminaari all kui ei ole öeldud teisiti. Nahatükkidelt eemaldati etanooli lahus ja lisati esiteks 900 µl milli-Q vett ja seejärel 100 µl 30% H₂O₂ lahust (*AppliChem GmbH, Cat. No. 141076*). Nahatükke inkubeeriti 15 minutit segajal (*Biosan Cat. No. RS-24 Mini-Rotator*) toatemperatuuri juures. Pärast seda detsellulariseeritavad nahatükid pesti 2 korda 15 minutit 1 ml milli-Q veega samal segajal toatemperatuuri juures. Järgmisena inkubeeriti nahatükke 1 ml lahuses B (1% Triton X-100, 0,26% Tris ja 0,69% EDTA) samal segajal 6 tundi toatemperatuuril. Seejärel vahetati kasutatud lahus B sama koguse uue lahuse B vastu ning inkubeeriti nahatükke samal segajal üleöö toatemperatuuril.

3. päev.

Nahatükkidelt eemaldati kasutatud lahus B ja pesti 6 korda 15 minutit 1 ml milli-Q veega samal segajal toatemperatuuril. Lõpuks paigutati nahatükid paigutati 96-kannulise plaadi kannudesse ning lisati 200 µl söödet A (89% DMEM, 10% FBS ja 1% Pen-Strep lahust). Detsellulariseeritud nahatükke inkubeeriti söötmes A 48 tundi, 5% CO₂, 37°C juures.

2.2.4 Rakkude kasvatamine detsellulariseeritud nahatükki peal

Töös kasutati inimese immortaliseerunud keratinotsüütide liini HaCaT ja primaarsed inimese dermaalsed fibroblastid, mis on saadud prof. Külli Kingo uurimisgrupilt. HaCaT rakud on saadud dr. Ana Rebase uurimisgrupilt.

Külmutatud primaarsed inimese dermaalsed fibroblastid või HaCaT rakud sulatati ning suspendeeriti 10 ml söötmes A (89% DMEM, 10% FBS ja 1% Pen-Strep lahust). Siis rakud tsentrifuugiti 300g, 5 minutit toatemperatuuri juures ja supernatant eemaldati. Rakud suspendeeriti 3 ml uues söötmes A ja külvati Petri tassile (Ø = 10 cm), kus eelnevalt oli lisatud 7 ml sama söödet.

Rakud kasvatati söötmes A inkubaatoris 5% CO₂ ja 37°C juures kuni konfluentsuseni 75% ja seejärel trüpsiniseeriti. Lühidalt, rakud loputati üks kord 10 ml steriilse PBS-iga ja seejärel lisati 5 ml 0,05% trüpsiin, 0,02% EDTA lahust. Rakke inkubeeriti 5 minutit, 5% CO₂ ja 37°C juures ja seejärel suspendeeriti ettevaatlikult. Suspendeeritud rakud segati 15 ml söötmega A,

tsentrifuugiti (*Sigma, Cat. No. 4-16K*) 300×g, 5 minutit toatemperatuuri juures. Supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti 2 ml söötmes A. Rakkude kontsentratsioon mõõdeti kasutades Neubauer kambrit (*Marienfeld Superior, Cat. No. 0640030*) ja mikroskoopi (*Nikon Corporation, Cat. No. Eclipse TS100*). 2×10^5 rakku külvati eelnevalt valmistatud detsellulariseeritud nahatükile. Lõpuks lisati värsket söödet A lõppmahuni 200 µl. Rakke kasvatati inkubaatoris 5% CO₂, 37°C juures 1 nädal.

Rakkude külmutamiseks need tsentrifuugiti (*Sigma, Cat. No. 4-16K*) 300×g, 5 minutit toatemperatuuri juures ja supernatant eemaldati. Rakud suspendeeriti külmutussegus (50% söödet A, 40% FBS ja 10% DMSO) ning krüoviaalid rakususpensiooniga jahutati aeglaselt külmutuskastis -80°C juures 24 tunni jooksul. Seejärel hoiustati krüoviaalid vedelas lämmastikus.

Immunofluorestsentsanalüüsiks kasvatati 1×10^4 rakku söötmes A katteklaasidel, mis olid asetatud 24 kannuga plaadi kannudesse 3 päeva inkubaatoris 5% CO₂ ja 37°C juures kuni konfluentsuseni 25%.

2.2.5 Kultiveeritud rakkude immunofluorestsentsanalüüs

1. päev.

Katteklaasidel olevad rakud pesti kaks korda 1 ml PBS-iga ja fikseeriti 300 µl 4% paraformaldehüüdis (PFA) 10 minutit toatemperatuuril. Seejärel rakud pesti kolm korda 1 ml PBS-is ning permeabiliseeriti 300 µl 0,1% Triton X-100 lahusega PBS-is 15 minutit toatemperatuuril. Siis rakud pesti veel kolm korda 1 ml PBS-iga ning inkubeeriti 50 µl blokeerimislahuses (4% eesli seerumi PBS-is) niiskes kambris 1 tund toatemperatuuril. Seejärel inkubeeriti rakke primaarsete antikehadega 50 µl blokeerimislahuses 4°C juures niiskes kambris üleöö. Kasutatud antikehad on toodud tabelis 3.

2. päev.

Rakud pesti kolm korda 5 minutit 1 ml PBS-iga toatemperatuuril. Järgmisena inkubeeriti rakke sekundaarsete antikehadega, mis olid lahustatud 50 µl blokeerimislahuses 1 tund toatemperatuuril niiskes kambris. Seejärel pesti rakke kolm korda 5 minutit 1 ml PBS-iga toatemperatuuril. Tuumade värvimiseks inkubeeriti rakke 300 µl DAPI lahuses (lõppkontsentratsioon 0,5 µg/ml) 2 minutit toatemperatuuril. Siis pesti rakke kolm korda 5 minutit 1 ml PBS-iga toatemperatuuril. Katteklaasid sulundati sulundusvedelikuga (*Dako, Cat. No. S3023*) ning analüüsiti konfokaalmikroskoobiga FV1000 (*Olympus*). Piltide töötlemisel kasutati dekonvolutsioniks AutoQuant X3 tarkvara (versioon X3.0.4) ja seejärel

TIF-piltide ja 3D-animatsioonide saamiseks Imaris tarkvara (versioon 7.6.5) mõõteskaala paigutamiseks.

Tabel 3. Töös kasutatud antikehad. Tabelis on esitatud immunofluorestsentsanalüüsidel kasutatud antikehad. Tulbas „Sihtmärk“ on valgu nimetuse järel sulgudes fluorestseeruv värv, mis antud antikehale on konjugeeritud. PE-Cy5: fukoeritriin-tsüaniin 5.

| Primaarsed antikehad | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------|------------------|-------------------|-------------------------|
| Sihtmärk | Peremeesorganism | Lahjendus | Tootja | Kataloogi number |
| Inimese tüüp I kollageen | Hiir | 1:2000 | abcam | ab34710 |
| Hiire tüüp I kollageen | Küülik | 1:200 | abcam | ab90395 |
| K5 | Küülik | 1:200 | abcam | ab53121 |
| K10 | Küülik | 1:200 | ATLAS ANTIBODIES | PA012014 |
| Vimentin | Küülik | 1:250 | abcam | ab92547 |
| α -SMA | Küülik | 1:500 | EPITOMICS | 5264-1 |
| Integriin $\alpha 6$ (PE-Cy5) | Rott | 1:10 | BD Biosciences | 551129 |
| Integriin $\beta 4$ (Alexa Fluor 647) | Hiir | 1:200 | R&D SYSTEMS | FAB4060R-100UG |
| Sekundaarsed antikehad | | | | |
| Sihtmärk | Peremeesorganism | Lahjendus | Tootja | Kataloogi number |
| Küüliku IgG (Alexa Fluor 488) | Eesel | 1:1000 | Life Technologies | A21206 |
| Küüliku IgG (Alexa Fluor 594) | Eesel | 1:1000 | Life Technologies | A21207 |
| Roti IgG (Alexa Fluor 594) | Eesel | 1:1000 | Life Technologies | A21209 |
| Hiire IgG (Alexa Fluor 594) | Eesel | 1:1000 | Life Technologies | A21203 |
| Hiire IgG (Alexa Fluor 647) | Eesel | 1:1000 | Life Technologies | A31571 |

2.2.6 Koelõikude immunofluorestsentsanalüüs

Töötlemata ja detsellulariseeritud nahatükidest valmistati krüoblokid OCT segus (*Sakura, Cat. No. Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound*) külmutamise teel. Seejärel krüoblokid lõigati krüotoomiga (*SLEE, Cat. No. 10160000*) 40 µm paksusega koelõikudeks, mis asetati alusklaasidele (*Thermo Scientific, Cat. No. J1800AMNZ*).

Edasine värvimine toimus nagu kirjeldatud lõigus 2.2.5.

2.2.7 Konditsioneeritud söötmete valmistamine

Konditsioneeritud söötmete valmistamiseks kasutati varasemalt kirjeldatud modifitseeritud meetodit (Klaas jt., 2016). Kasutatud plasmiidid on toodud tabelis.

1. päev.

H1299 rakke kasvatati inkubaatoris 5% CO₂ ja 37°C juures, trüpsiniseeriti kasutades 0,05% trüpsiin, 0,02% EDTA lahust ning külvati tihedusega $1,3 \times 10^6$ rakku 10 cm tassi kohta 10 ml söötmes B (89% DMEM ilma fenoolpunaseta, 10% FBS ja 1% Pen-Strep lahust). Rakud kasvatati üleöö inkubaatoris 5% CO₂ ja 37°C juures. Järgnevalt transfecteeriti rakke THBS4 ekspressioonikonstruktiga TurboFect reagenti (*Thermo Scientific, Cat. No. R0531*) abil. Selleks segati 1 ml DMEM söödet, 16,68 µg plasmiidset DNA-d ja 22,2 µl TurboFecti ning inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Samal ajal asetati rakkudele sööde C (98% DMEM, 1% 100× ITS lahust ning 1% Pen-Strep lahust). Seejärel lisati transfectsioonisegu ning inkubeeriti 24 tundi 5% CO₂ ja 37°C juures. Kasutatud plasmiidid on toodud tabelis 4.

2. päev.

Rakkudele lisati 100 µl 100× ITS lahust ühe tassi kohta ning inkubeeriti 24 tundi 5% CO₂ ja 37°C juures.

3. päev.

Konditsioneeritud söötmed koguti ning tsentrifuugiti (*Sigma, Cat. No. 4-16K*) 5100 RPM, 10 minutit. Supernatandid külmutati -20°C juures kuni kasutamiseni.

Tabel 4. Töös kasutatud plasmiidid.

| Plasmiiidi nimi | Vektor | Geen | Promootor | Terminaator | Marker | Päritolu |
|--------------------------|--------------------|--------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------|-----------------------|
| <i>pcDNA3.1(+)</i> | <i>pcDNA3.1(+)</i> | - | - | - | <i>NeoR</i> | Labori kollektatsioon |
| <i>pcDNA3.1Zeo_Thbs4</i> | <i>pcDNA3.1(+)</i> | <i>THBS4</i> | <i>CMV</i> <i>promootor</i> | <i>bGH</i> <i>terminaator</i> | <i>NeoR</i> | Labori kollektatsioon |

2.2.8 Western blot

Western blot katse jaoks kasutati varasemalt kirjeldatud meetodit (Klaas jt., 2016).

2.2.8.1 Konditsioneeritud söötmete proovide ettevalmistamine

Igast tuubist võeti 4 ml söödet valgu ekspressiooni analüüsiks, mis jahutati 4°C juures ja lisati proteaasi inhibiitorite segu (*Thermo Scientific, Cat. No. 78430*) ja NaN_3 lahust (lõppkontsentratsioon 0,04%). Siis söötmete proovid dialüüsiti kasutades dialüüsikotte (*Spectrum Medical Industries, Cat. No. 132678*) ja PEG40000 (*Serva GmbH, Cat. No. 33139*) kuni ruumala väheneb 400 – 500 µl-ini. Seejärel segati 12 µl igast proovist ning lisati sellele 100 µl WR lahust vastavalt valmistaja juhendile (*Thermo Scientific, Cat. No. 23227*). Järgnevalt mõõdeti A_{540} väärtused spektrofotomeetri (*Thermo Electron, Cat. No. 51118300*) abil.

Ülejäänud söötmete proovid jagati 200 µl alikvootideks 1,5 ml tuubidesse ja neid lahjendati 5 korda atsetooniga, mida eelnevalt jahutati -20°C juures. Pärast seda sadestati valgud tsentrifuugis (*Hettich, Cat. No. 2205 „MIKRO 200R“*) 13000 RPM, 15 minutit 4°C juures, eemaldati supernatant ja sade lahustati milli-Q vees (1 tuubi kohta 87 µl). Järgnevalt mõõdeti veel kord valgukontsentratsioon nagu ülal kirjeldatud. Pärast seda lisati igasse tuubi 25 µl 4× Laemmli puhvrit (40% glütserool, 0,25 M Tris-HCl pH=6,8, 8% SDS, 0,008% bromofenool sinine ja 20% β-merkaptotetanooli). Valmis proovid säilitati -20°C juures kuni kasutamiseni.

2.2.8.2 Rakku proovide ettevalmistamine

Transfekteeritud rakud (lõik 2.2.7) trüpsiniseeriti kasutades 0,05% trüpsiin, 0,02% EDTA lahust 5 minutit 5% CO_2 ja 37°C juures. Rakud suspendeeriti ning igast proovist võeti 5 ml, mis segati söötmega A (5 ml suspensiooni kohta 15 ml söödet) ja tsentrifuugiti (*Sigma, Cat. No. 4-16K*) 300×g 5 minutit 4°C juures. Supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti 1 ml PBS-is. Rakud tsentrifuugiti (*Hettich, Cat. No. 2205 „MIKRO 200R“*) 5000 RPM, 10 minutit

4°C juures ning eemaldati supernatant. Järgmisena rakud suspendeeriti 120 µl lüüsipuhvis (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH=8,0 ja 1% NP-40). Rakud lüüsi jäa peal 1 tunni jooksul ning lisati tsentrifuugiti (*Hettich, Cat. No. 2205 „MIKRO 200R“*) 12000 RPM, 15 minutit 4°C juures. 120 µl supernatandi pipeteeriti uude tuubi. Igast rakulüsaadist kasutati 12 µl lahust valgukontsentratsiooni mõõtmiseks, kasutades üleval kirjeldatud BCA meetodit. Ülejäänud rakulüsaatidele lisati 4× Laemmli puhvrit (1 tuubi kohta 36 µl) ja külmutati -20°C juures kuni kasutamiseni.

2.2.8.3 Elektroforees ja valkude ülekande PVDF membraanidele

Alguses valkude lahused Laemmli puhvis kuumutati 99°C juures 5 minutit. Siis valgud lahutati naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid-geelis elektroforeesi teel. Kontsentreeriva geeli kontsentratsioon oli 5% ja lahutava geeli kontsentratsioon oli 10%. Ühele rajale lisati 5 µl eelvärvitud markervalkude segu (*Thermo Scientific, Cat. No. 26616*). Kui valgud olid geelis lahutunud, kanti need üle PVDF (polüvinülideenfluoriid) membraanile (*Thermo Scientific, Cat. No. 88520*). Selleks kasutati „märja“ ülekande meetodit. Protsess viidi läbi ülekandeaparaadil (*Cleaver Scientific, Cat. No. SB10-HI*) 1 tunni jooksul 100 V juures.

Kasutatud puhverlahused:

1. jooksupuhver: 25 mM Tris-HCl (pH=8,3), 250 mM glütsiini ja 0,5% SDS;
2. ülekandepuhver: 50 mM Tris-HCl (pH=8,3), 40 mM glütsiini, 1,3 mM SDS, 20% metanooli.

2.2.8.4 Antikehade seondumine ja töötlemine aluselise fosfataasiga

Peale ülekannet blokeeriti membraani PBS-is, milles oli 5% veise seerumi albumiini (BSA) ja 0,1% Tween-20. Blokeerimine viidi läbi tunni aja jooksul, loksutades toatemperatuuril. Blokeeritud membraani inkubeeriti primaarse antikehaga, mis oli lahustatud blokeerimise lahuses, 1 tunni jooksul toatemperatuuril loksutades. Järgnevalt pesti membraani 3 korda 5 minutit 0,1% Tween-20 PBS-is toatemperatuuril loksutades. Seejärel blokeeriti membraani teist korda 5% BSA, 0,1% Tween-20 ja 2,5% lõssipulbrit PBS-is 1 tunni jooksul loksutades toatemperatuuril. Seejärel membraani inkubeeriti sekundaarse antikehaga, mis oli lahustatud teises blokeerimislahuses, 1 tund toatemperatuuril loksutades. Siis membraani pesti 3 korda 5 minutit 0,1% Tween-20 PBS-is toatemperatuuril ning inkubeeriti streptavidiin-AP hübriidvalguga (*DakoCytomation, Cat. No. D0396*), mis oli lahustatud 5% BSA, 0,1% Tween-20 ja 2,5% lõssipulbrit PBS-is (lahjendus 1:3000), 1 tunni jooksul toatemperatuuril

loksutades. Siis pesti membraani 2 korda 5 minutit 0,1% Tween-20 PBS-is ja 1 kord 5 minutit AP puhvris (50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 M Tris-HCl pH=9,5). Lõpuks inkubeeriti membraani substraadi lahuses (0,04125 mg/ml BCIP ja 0,33 mg/ml NBT AP puhvris).

Tabel 5. Western blot katses kasutatud antikehad. Sekundaarne antikeha on biotinüleeritud.

| Primaarsed antikehad | | | | |
|------------------------|------------------|-----------|-------------|------------------|
| Sihthärg | Peremeesorganism | Lahjendus | Tootja | Kataloogi number |
| Inimese THBS4 | Kits | 1:1000 | R&D SYSTEMS | AF2390 |
| Sekundaarsed antikehad | | | | |
| Sihthärg | Peremeesorganism | Lahjendus | Tootja | Kataloogi number |
| Kitse IgG (biitiin) | Küülik | 1:5000 | Dako | E0466 |

2.2.9 Statistiline analüüs

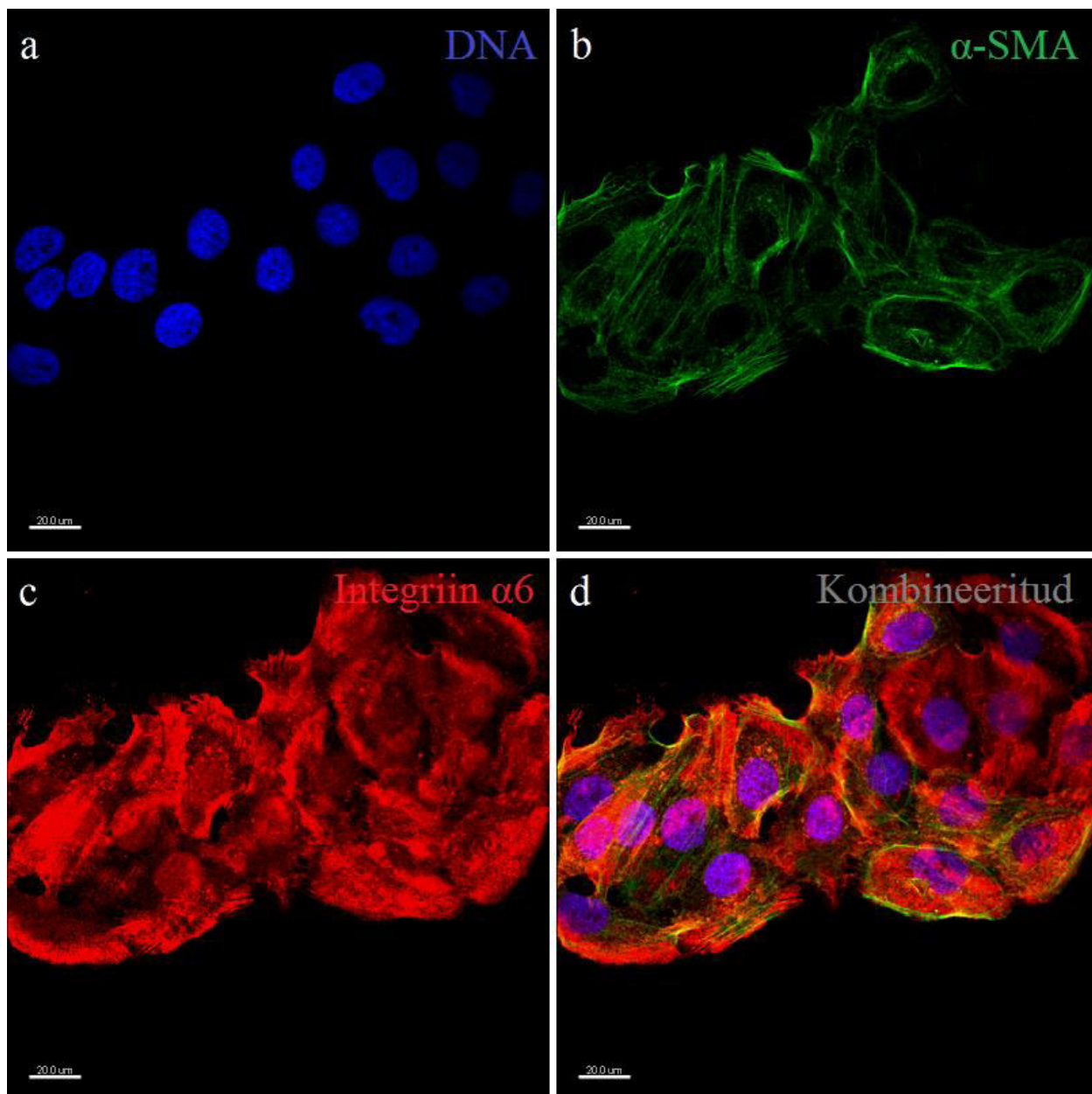
Tulemuste statistilist olulisust testiti kasutades kolme sõltumatu bioloogilise katse andmeid ja kahepoolset sõltumatut Studenti t-testi. Kõik arvutused on tehtud tarkvaraga Microsoft Office Excel 2010. P-väärtusel alla 0,05 loeti tulemus statistiliselt oluliseks.

2.3 Tulemused

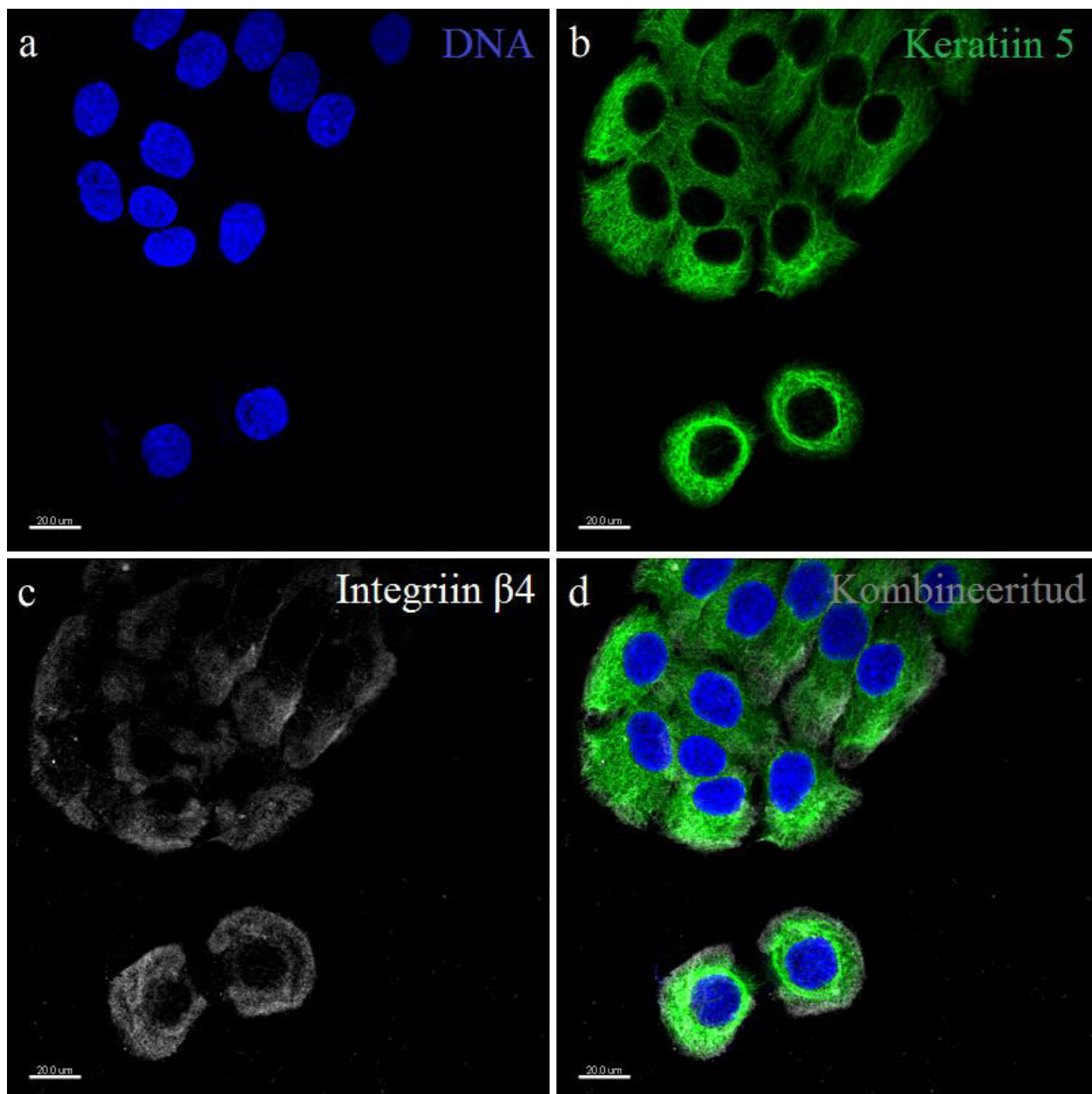
2.3.1 HaCaT rakud on integriin $\alpha 6^{+}$ integriin $\beta 4^{+}$ K5⁺ K10⁻ VIM⁻ α -SMA⁺ rakud

Kuna HaCaT rakud näol on tegu immortaliseerunud aneuploidse keratinotsüütide liiniga, kus on toimunud mitmed genoomsed ümberkorraldused (Boukamp jt., 1988) pidin selleks, et saaks usaldusväärselt eristada HaCaT rakke dermaalsetest fibroblastidest, selgitama, kas HaCaT rakud ekspresseerivad fibroblastide markereid α -SMA ja vimentiin. Lisaks kontrollisin, kas HaCaT rakud ekspresseerivad $\alpha 6 \beta 4$ integriini ja tsütokeratiine 5 ja 10.

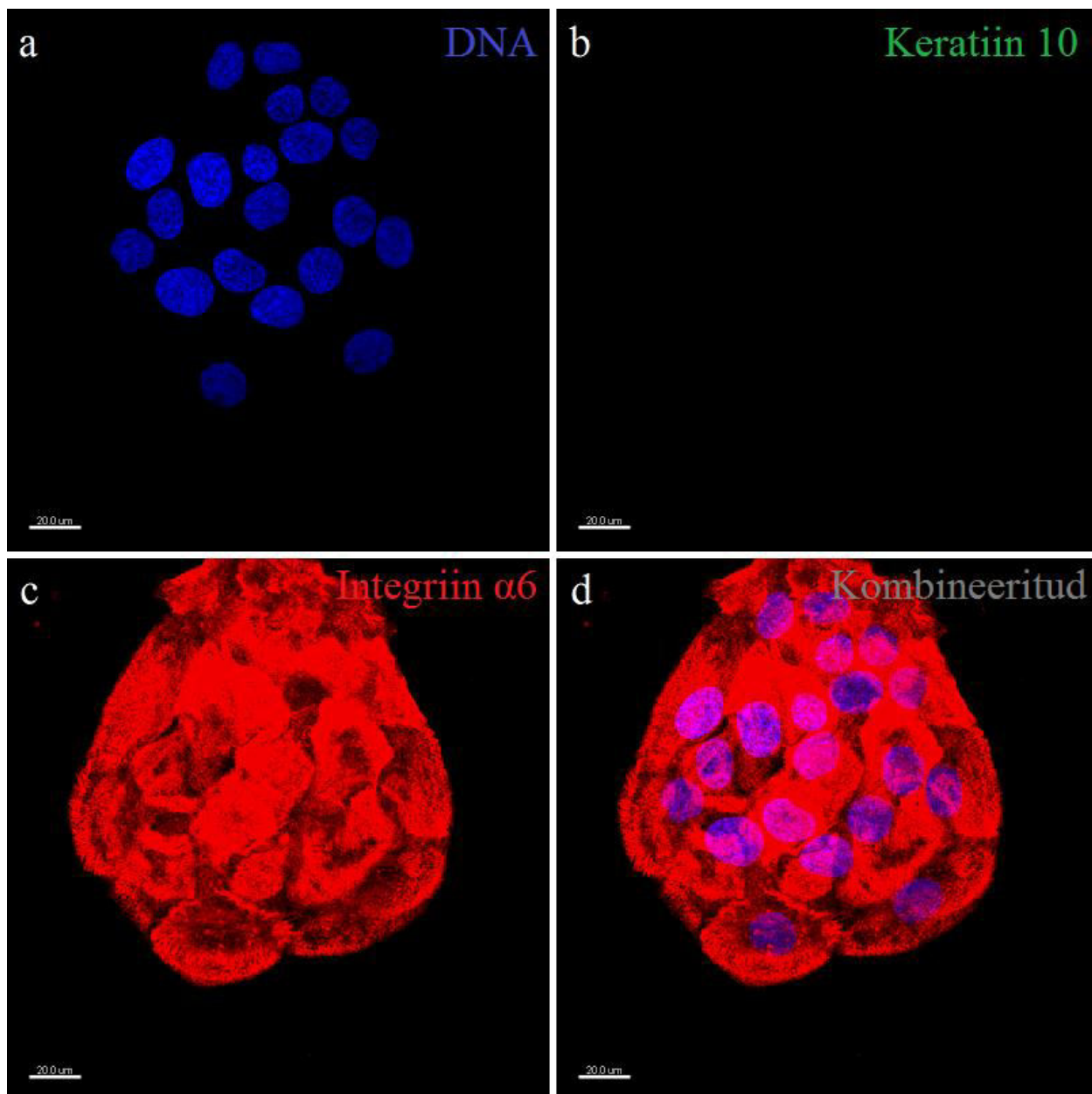
Rakkude immunofluorestsentsanalüüsi tulemusena selgus, et HaCaT rakud ekspresseerivad α -SMA-d, integriin $\alpha 6$ ja $\beta 4$ (joonised 4-7). Samuti immunofluorestsentsanalüüs kinnitas, et HaCaT rakud ekspresseerivad K5 (joonis 5). Lisaks näitas immunofluorestsentsanalüüs, et HaCaT rakud ei ekspresseeri K10 ja vimentiini (joonised 6 ja 7). Valisin HaCaT rakkude markeriks edasistes katsetes K5.



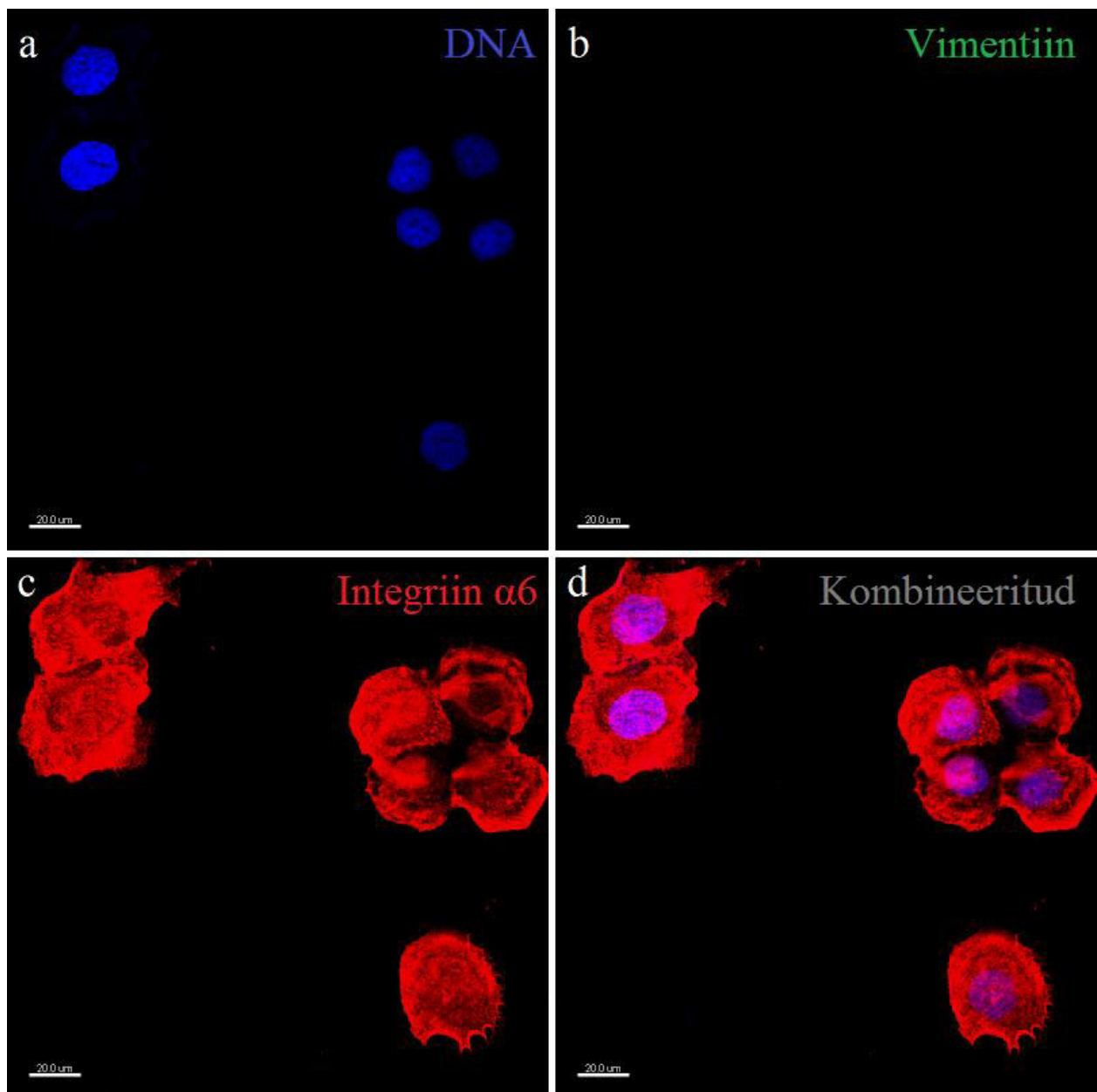
Joonis 4. HaCaT rakud ekspresseerivad integriin $\alpha 6$ ja α -SMA. (a) DNA, (b) α -SMA ja (c) integriin $\alpha 6$. (d) kombineeritud pilt. Mõõtlõik 20 μ m.



Joonis 5. HaCaT rakud ekspresseerivad integriin $\beta 4$ ja keratiin 5 (K5). (a) DNA, (b) K5 ja (c) integriin $\beta 4$. (d) kombineeritud pilt. Mõõtlõik 20 μm .



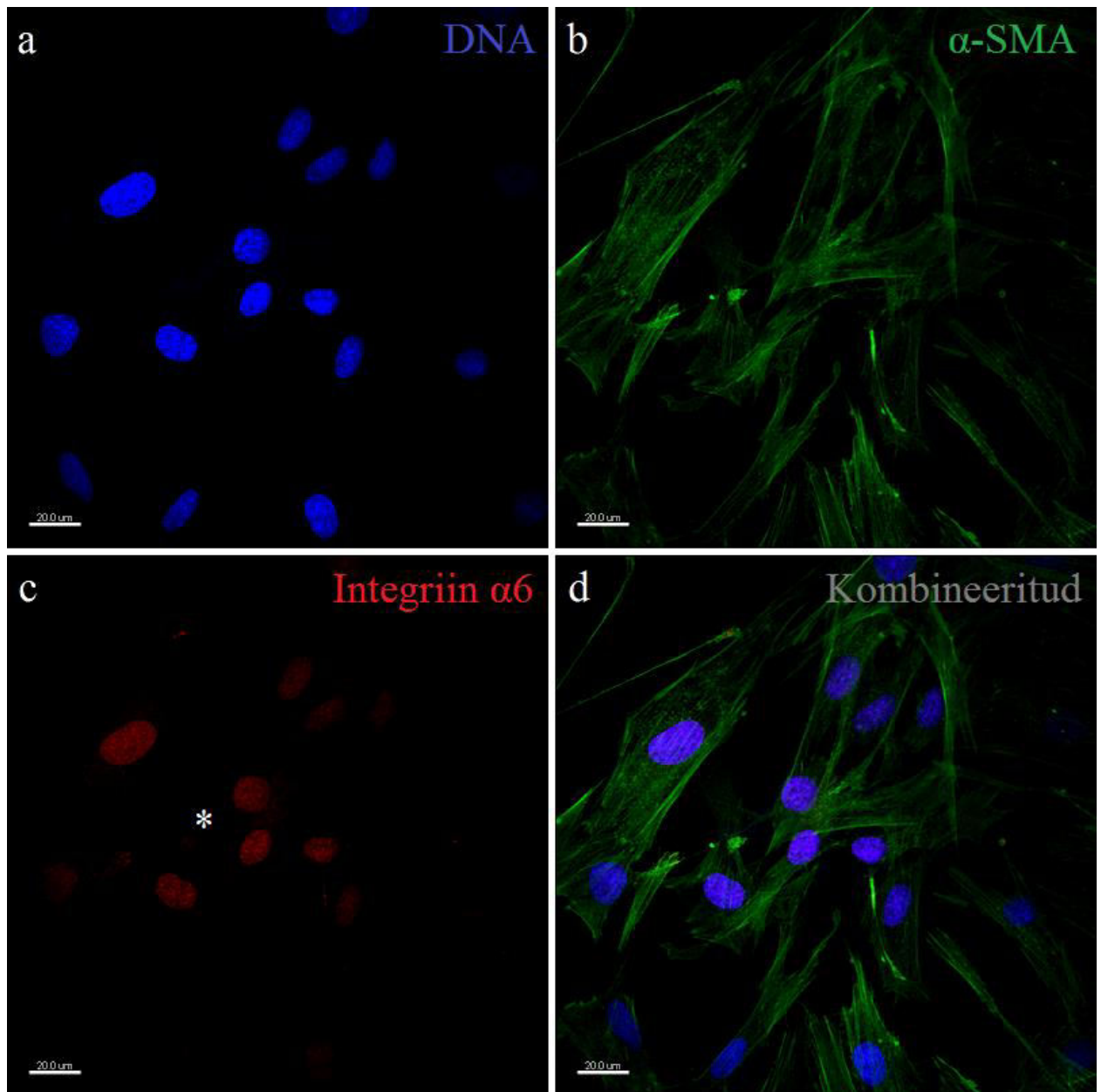
Joonis 6. HaCaT rakud ekspresseerivad integriin $\alpha 6$ ja ei ekspresseeri keratiin 10 (K10).
 (a) DNA, (b) K10 ja (c) integriin $\alpha 6$. (d) kombineeritud pilt. Mõõtlõik 20 μm .



Joonis 7. HaCaT rakud ekspresseerivad integriin $\alpha 6$ ja ei ekspresseeri vimentini. (a) DNA, (b) vimentin ja (c) integriin $\alpha 6$. (d) kombineeritud pilt. Mõõtlõik 20 μm .

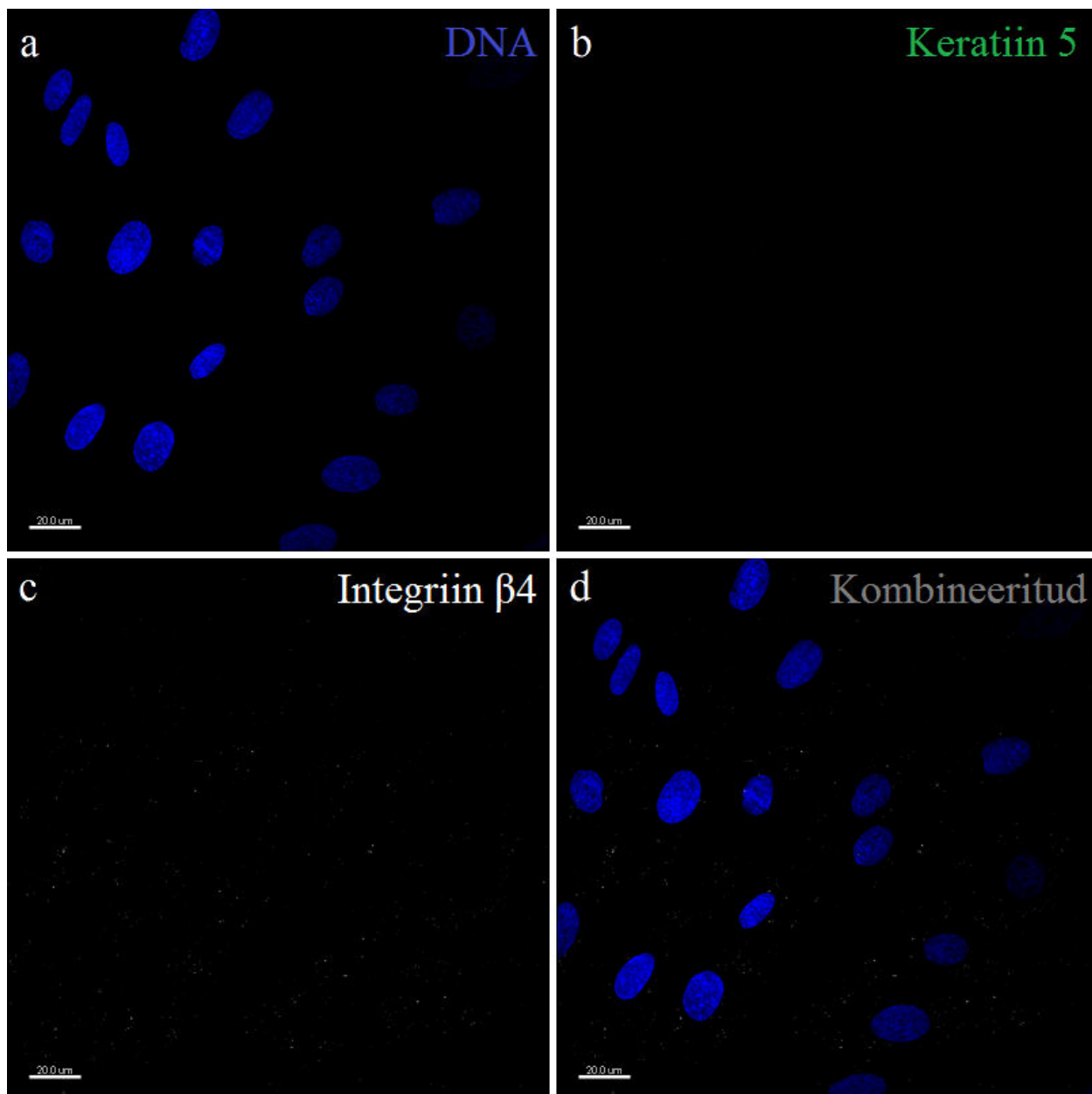
2.3.2 Inimese dermaalsed fibroblastid ekspresseerivad vimentini ja α -SMA-d

Järgmisena uurisin α -SMA, vimentini, $\alpha 6$, $\beta 4$ integriini ning tsütokeratiinide 5 ja 10 ekspressiooni inimese dermaalsetes fibroblastides. Rakkude immunofluorestsentsanalüüs kinnitas, et fibroblastid ekspresseerivad vimentini ja α -SMA-d (joonised 8 ja 11) kuid ei ekspresseeri K5, K10 ning integriin $\alpha 6$ ja $\beta 4$ (joonised 8-11) nagu oodatud. Valisin vimentini fibroblastide markeriks järgmiste katsete jaoks.

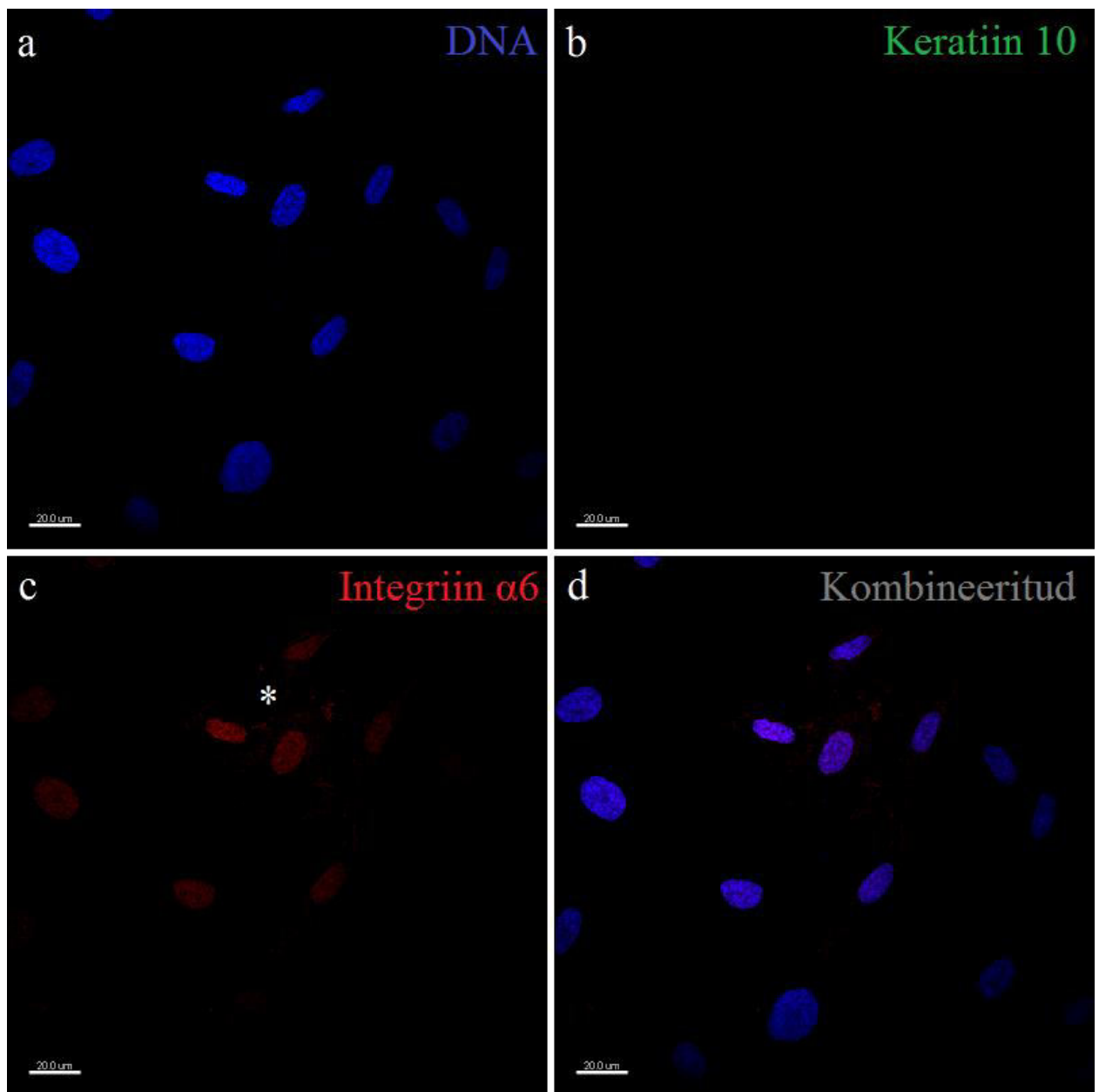


Joonis 8. Inimese dermaalsed fibroblastid ekspresseerivad α -SMA ja ei ekspresseeri integrin $\alpha 6$ (a) DNA, (b) α -SMA ja (c) integrin $\alpha 6$. (d) kombineeritud pilt. Mõõtlõik 20 μm .

* - mittespetsiifiline värvimine.

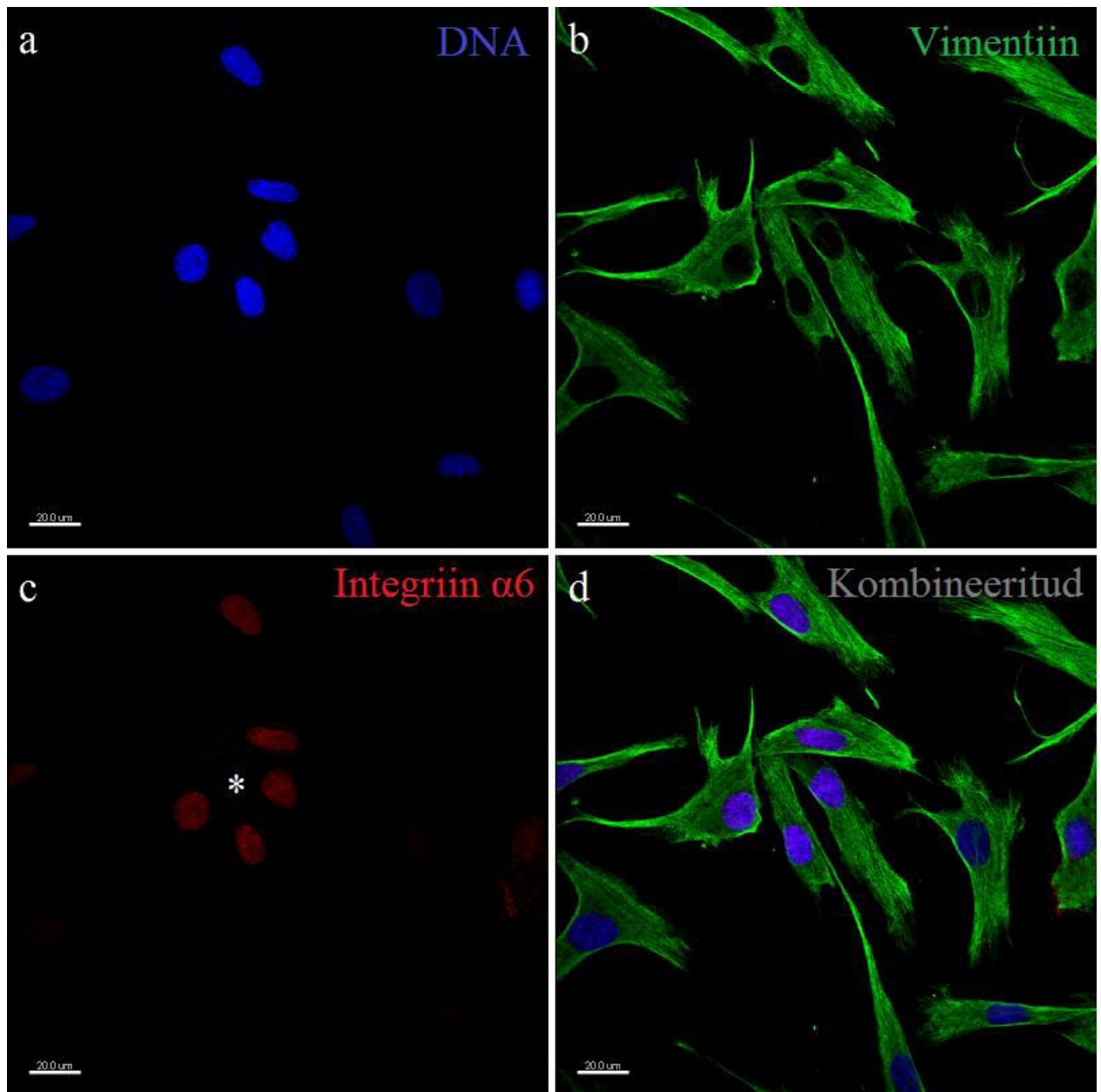


Joonis 9. Inimese dermaalsed fibroblastid ei ekspresseeri keratiin 5 (K5) ega integriin β4. (a) DNA, (b) K5 ja (c) integriin β4. (d) kombineeritud pilt. Mõõtlõik 20 μm.



Joonis 10. Inimese dermaalsed fibroblastid ei ekspresseeri keratiin 10 (K10) ega integriin $\alpha 6$. (a) DNA, (b) K10 ja (c) integriin $\alpha 6$. (d) kombineeritud pilt. Mõõtlõik 20 μm .

* - mittespetsiifiline värvimine.



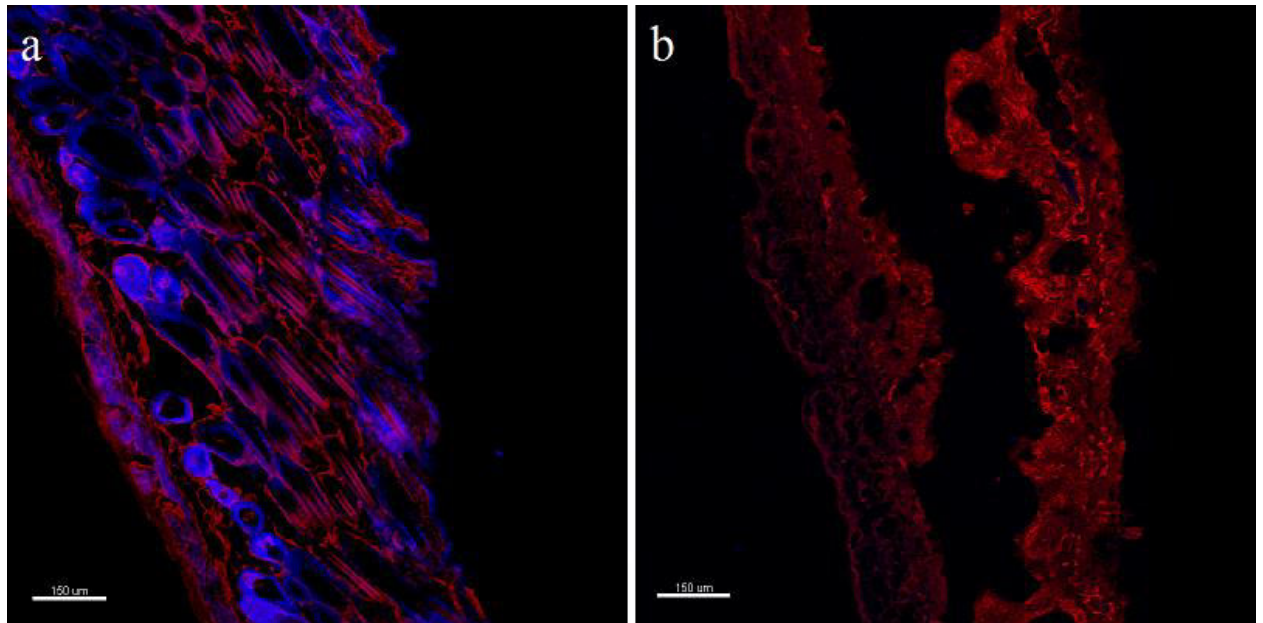
Joonis 11. Inimese dermaalsed fibroblastid ekspresseerivad vimentini ja ei ekspresseeri integrin $\alpha 6$. (a) DNA, (b) vimentiin ja (c) integrin $\alpha 6$. (d) kombineeritud pilt. Mõõtlõik 20 μm .

* - mittespetsiifiline värvimine.

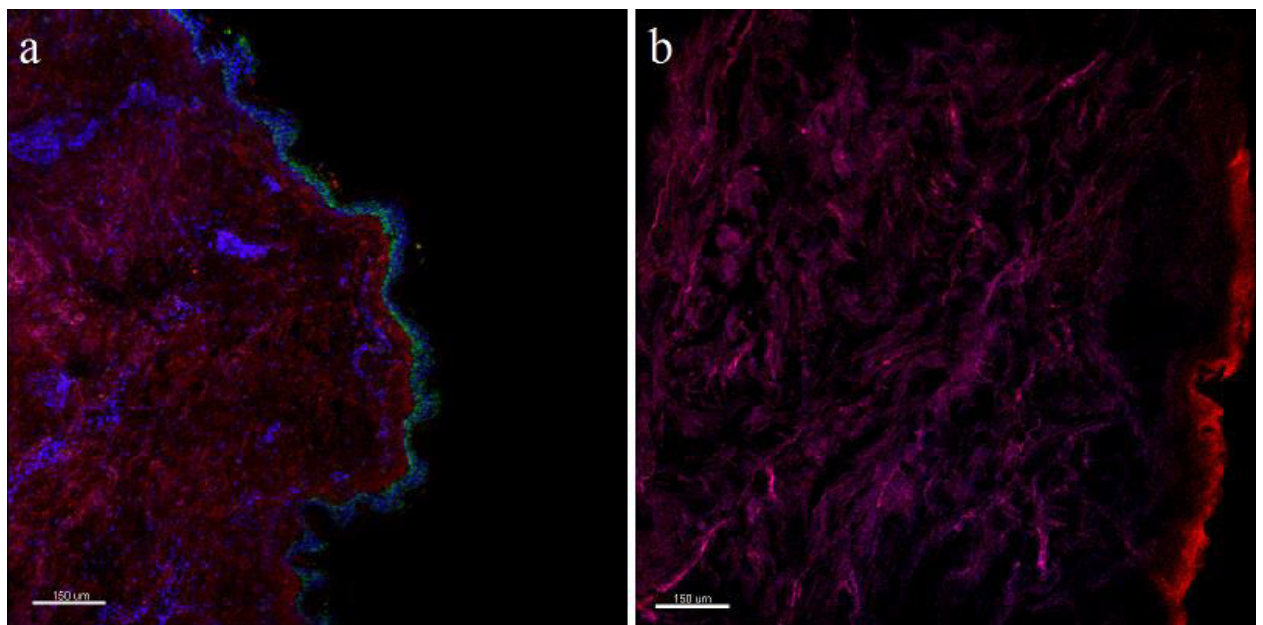
2.3.3 Trüpsiin-Triton X-100-põhise meetodiga saab detsellulariseerida inimese ja hiire nahka

Selleks, et saaks detsellulariseeritud RVM-i kasutada naha kolmemõõtmelise mudeli konstrueerimiseks, on vaja et rakkude eemaldamine oleks täielik. Detsellulariseeritud nahatükkidest tehti koelõigud ja teostati immunofluorestsentsanalüüs. Võrdluseks kasutati inimese ja hiire normaalseid nahatükke. Immunofluorestsentsanalüüs näitas, et

detsellulariseerimine on täielik, kuna nahatükis ei ole leitud ühtegi rakutuuma (joonised 12 ja 13).



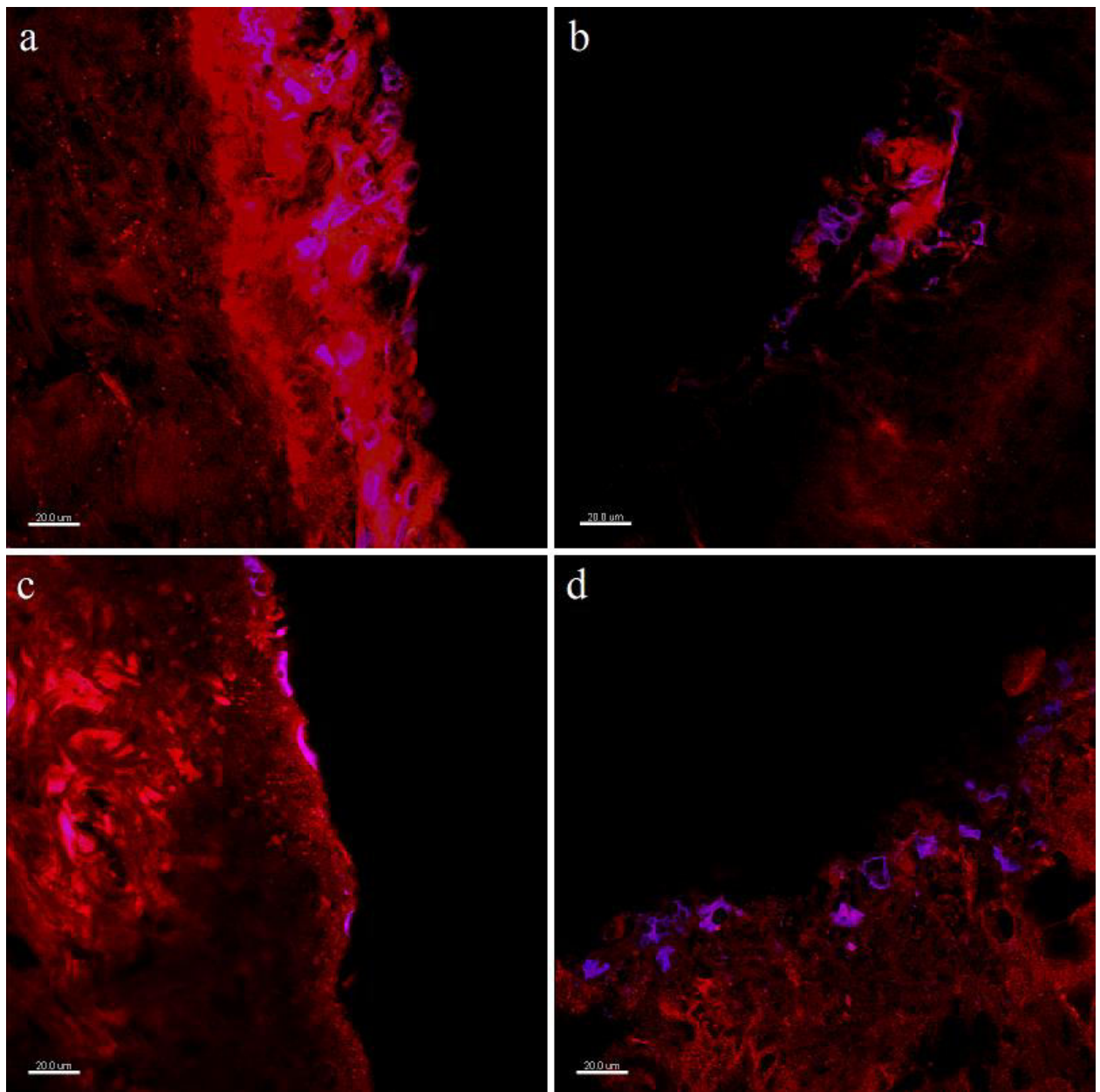
Joonis 12. Trüpsiin-Triton X-100 meetodiga saab läbi viia hiire naha täieliku detsellulariseerimise. Piltidel kujutatud: DNA (sinine) ja tüüp I kollageen (punane). (a) Töötlemata hiire nahk. (b) Detsellulariseeritud hiire nahk. Mõõtlõik 150 µm.



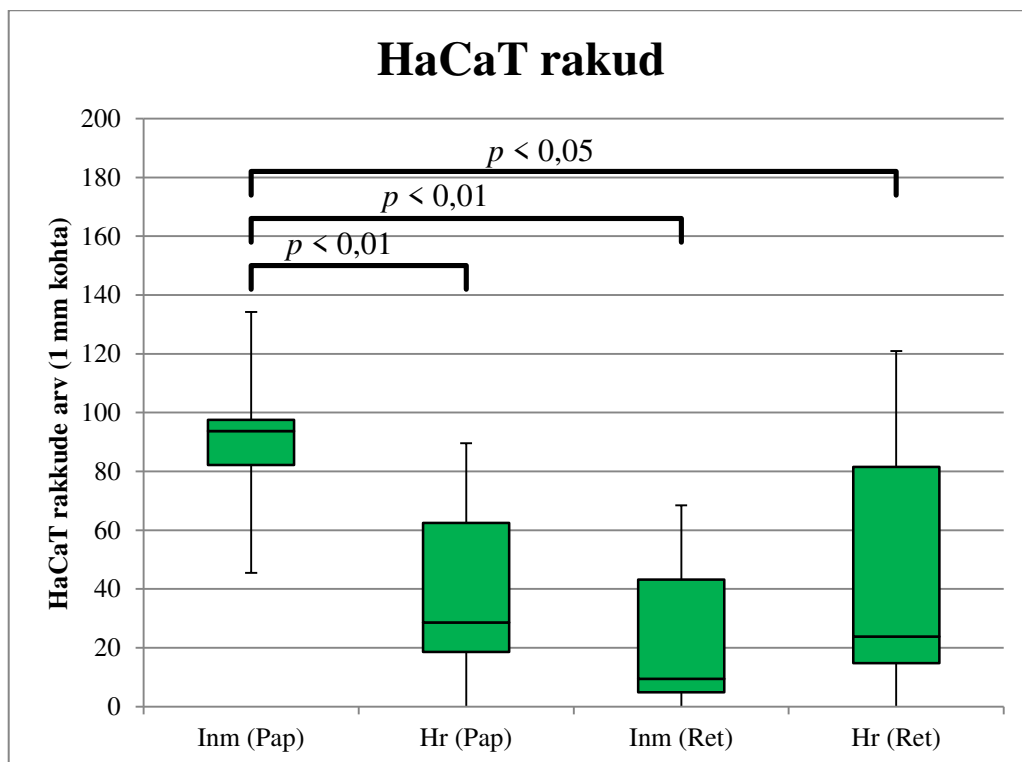
Joonis 13. Trüpsiin-Triton X-100 meetodiga saab läbi viia inimese naha täieliku detsellulariseerimise. (a) Töötlemata inimese nahk: DNA (sinine), tüüp I kollageen (punane) ja K5 (roheline). (b) Detsellulariseeritud inimese nahk. On värvitud: DNA (sinine), tüüp I kollageen (punane). Mõõtlõik 150 µm.

2.3.4 HaCaT rakud kinnituvad kõige paremini detsellulariseeritud inimese papillaarsele dermisele

Naha detsellulariseerimise tulemusena on võimalik eristada papillaarset ja retikulaarset dermist. Uuriti, kas HaCaT rakud kinnituvad mõlemale detsellulariseeritud nahatüki poolele võrdselt või nad eelistavad ühte poolt. Selleks viidi läbi katsete seeria, kus rakud olid külvatud mõlemale inimese ja hiire detsellulariseeritud naha fragmentide poolele. Selgus, et HaCaT rakud kinnituvad kõige paremini inimese detsellulariseeritud naha fragmendi papillaarsele dermisele (joonis 14a). Inimese detsellulariseeritud naha fragmendi retikulaarses dermises HaCaT rakud moodustasid kolooniaid, mis viitab rakkude jagunemisele (joonis 14b). Hiire detsellulariseeritud naha fragmentidele kinnitusid HaCaT rakud vaid üksikult (joonised 14c ja 14d). Statistiline analüüsi põhjal (joonis 15) otsustasin THBS4 tetimiseks kasvatada HaCaT rakud inimese detsellulariseeritud naha fragmendi papillaarsel dermisel.



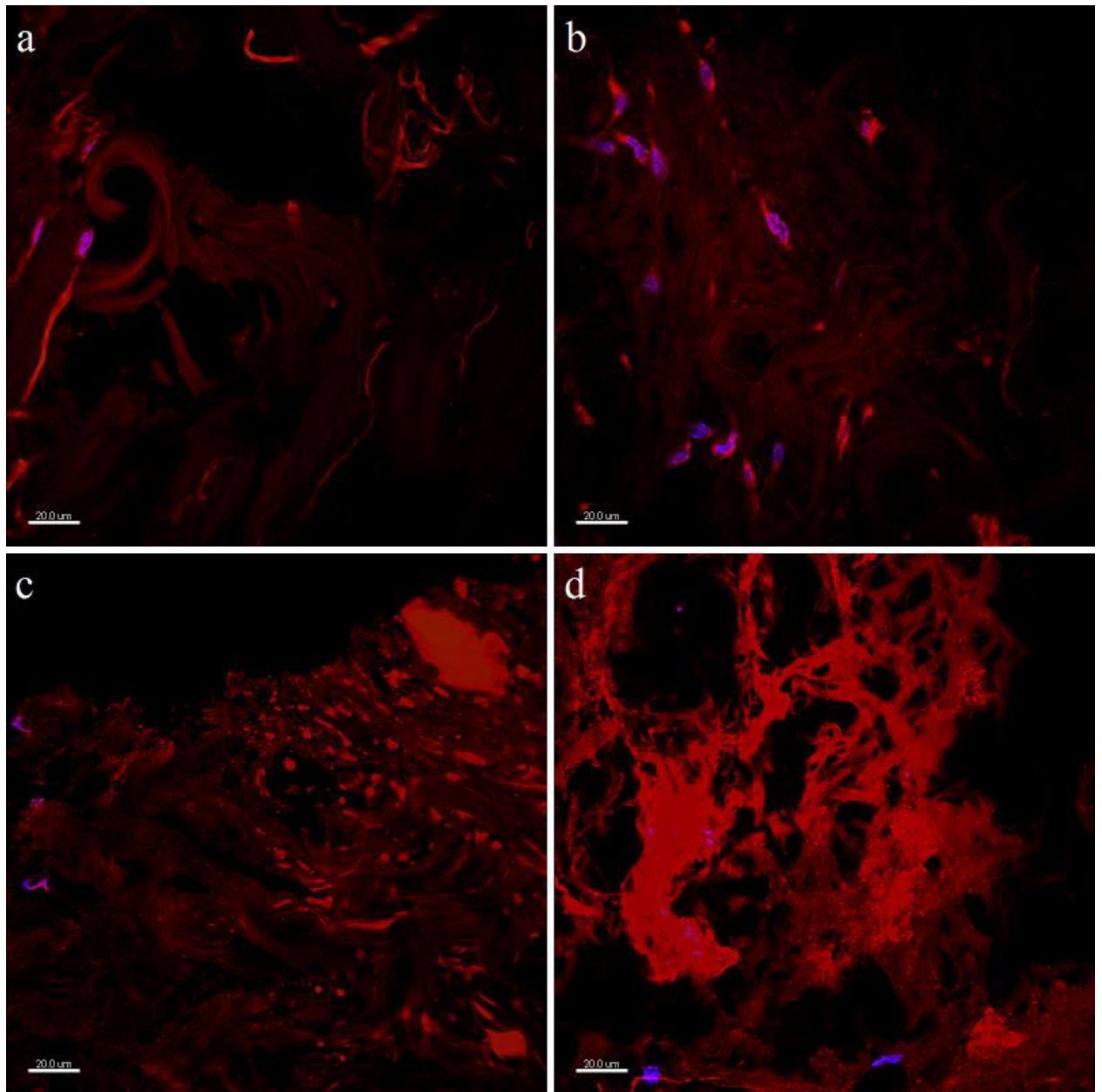
Joonis 14. HaCaT rakkude kasvatamine detsellulariseeritud naha fragmentidel erinevates orientatsioonides. DNA (sinine) ja tüüp I kollageen (punane). **(a)** ja **(b)** HaCaT rakud inimese detsellulariseeritud naha fragmentidel ning **(c)** ja **(d)** HaCaT rakud hiire detsellulariseeritud naha fragmentidel. **(a)** ja **(c)** HaCaT rakud on kasvatatud dermise papillaarsel poolel ning **(b)** ja **(d)** HaCaT rakud on kasvatatud dermise retikulaarsel poolel. Mõõtlõik 20 µm.



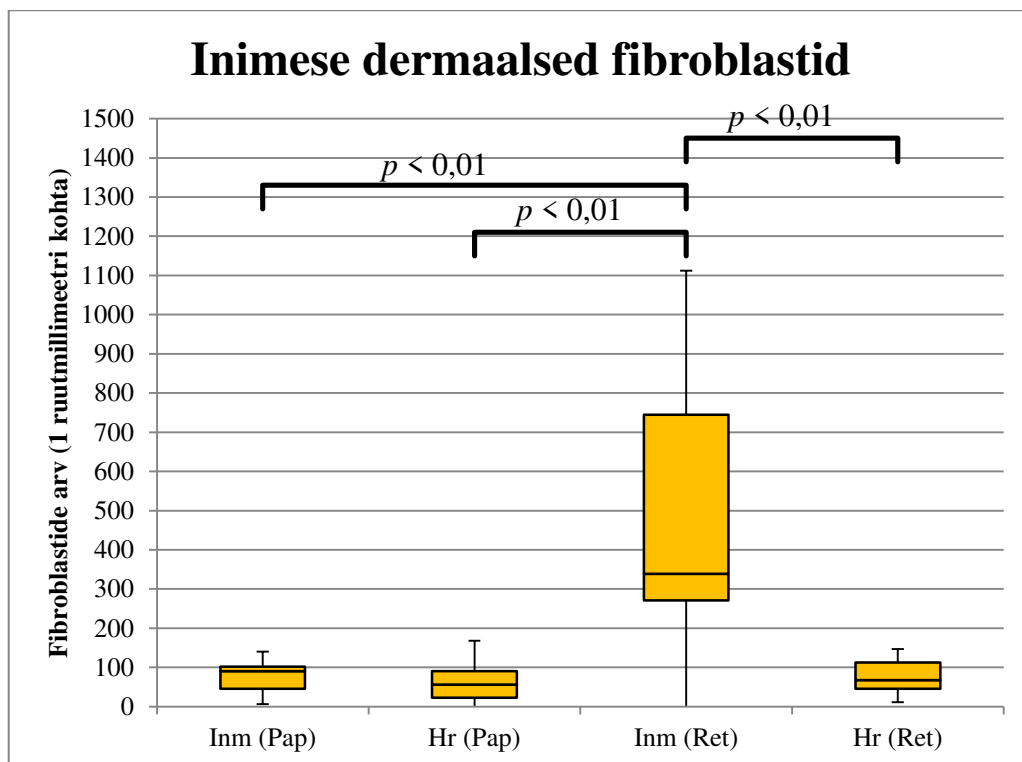
Joonis 15. HaCaT rakkude arv 1 mm detsellulariseeritud naha fragmendi kohta. Veapiirid näitavad standardhälvet, kasti ülemine külg näitab kolmanda kvartiili piiri, alumine külg näitab esimese kvartiili piiri, joon kastis näitab mediaani. Inm – inimese detsellulariseeritud nahk, Hr – hiire detsellulariseeritud nahk, Pap – rakud papillaarsel dermisel ja Ret – rakud retikulaarsel dermisel. Joonisel on toodud 3 sõltumatu katse tulemused, igast fragmendist on mõõdetud 3 lõiku. Statistiliselt olulised erinevused on näidatud joontega.

2.3.5 Inimese dermaalsed fibroblastid prolifereeruvad kõige paremini detsellulariseeritud inimese retikulaarse dermise sees

Järgmisena uuriti, kui efektiivselt toimub inimese dermaalsete fibroblastide levimine detsellulariseeritud naha fragmentides. Selleks viidi läbi katsete seeria, kus inimese dermaalsed fibroblastid olid külvatud inimese ja hiire detsellulariseeritud naha fragmentide kahele erinevale poolele. Selgus, et fibroblastid tungivad inimese detsellulariseeritud naha fragmendi retikulaarsesse dermisse paremini võrreldes teiste katsetingimustega (joonis 16). Statistiline analüüsi põhjal (joonis 17) otsustasin THBS4 tetimiseks kasvatada fibroblaste inimese detsellulariseeritud naha fragmendi retikulaarsel dermisel.



Joonis 16. Inimese dermaalsete fibroblastide kasvatamine detsellulariseeritud naha fragmentidel erinevates orientatsioonides. DNA (sinine) ja tüüp I kollageen (punane). **(a)** ja **(b)** inimese detsellulariseeritud naha fragmendid ning **(c)** ja **(d)** hiire detsellulariseeritud naha fragmendid. **(a)** ja **(c)** fibroblastid on külvatud papillaarse dermise poolele ning **(b)** ja **(d)** fibroblastid on külvatud retikulaarse dermise poolele. Mõõtlõik 20 µm.

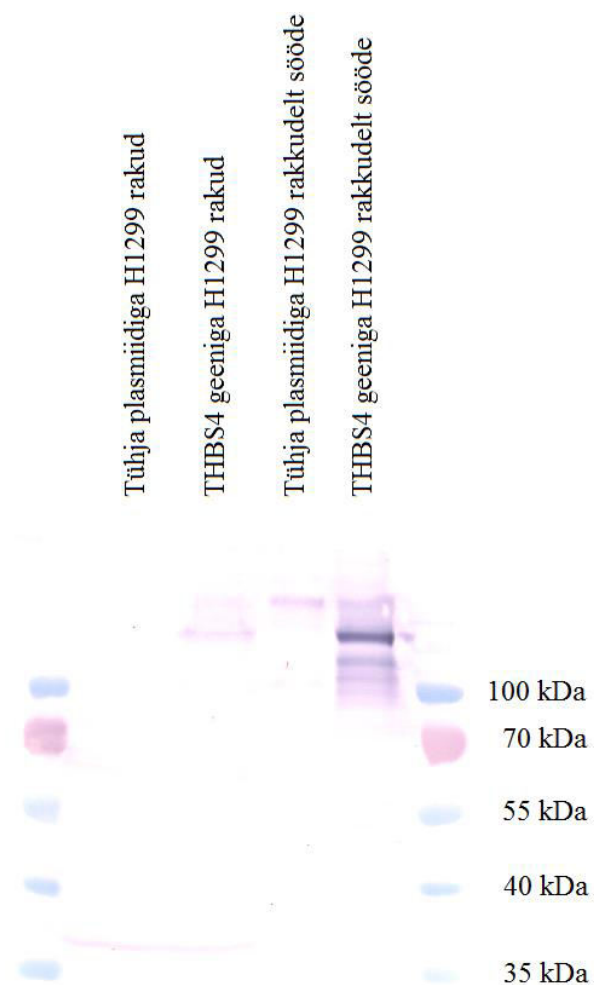


Joonis 17. Inimese dermaalsete fibroblastide arv 1 mm² detsellulariseeritud naha fragmendi kohta. Veapiirid näitavad standardhälvet, kasti ülemine külg näitab kolmanda kvartiili piiri, alumine külg näitab esimese kvartiili piiri, joon kastis näitab mediaani. Inm – inimese detsellulariseeritud nahk, Hr – hiire detsellulariseeritud nahk, Pap – rakud papillaarsel dermisel ja Ret – rakud retikulaarsel dermisel. Joonisel on toodud 3 sõltumatu katse tulemused, igast fragmendist on mõõdetud 3 lõiku. Statistiliselt olulised erinevused on näidatud joontega.

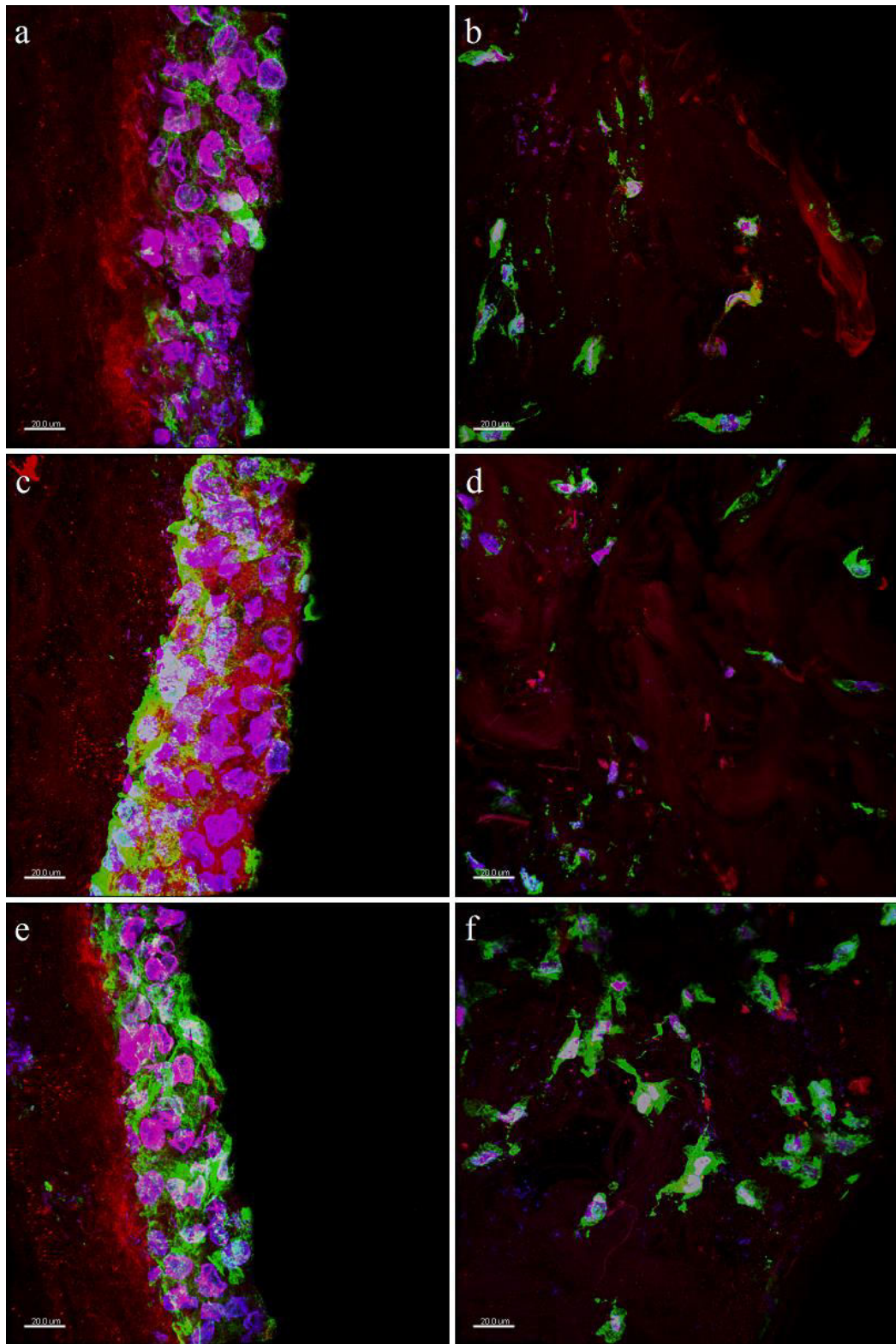
2.3.6 THBS4 suurendab inimese dermaalsete fibroblastide invasiooni detsellulariseeritud inimese nahka

Viimasena uuriti, kuidas RVM-i regulatoorne komponent trombospondiin 4 mõjutab HaCaT rakkudele ning inimese dermaalsete fibroblastide seondumist detsellulariseeritud nahale. Enne katse algust analüüsiti kontroll-söödet ning THBS4-konditsioneeritud söödet Western bloti abil. Trombospondiin 4 leiti ainult THBS4-konditsioneeritud söötmes (THBS4-sööde) (joonis 18). Peale Western bloti katset külvati HaCaT rakud inimese detsellulariseeritud naha fragmendi papillaarsele dermisele ning fibroblastid inimese detsellulariseeritud naha fragmendi retikulaarsele dermisele. Alguses rakud olid suspendeeritud söötmes A. Järgmisel päeval vahetati osa rakkude sööde kontroll-söötme vastu ning teise osa rakkude sööde

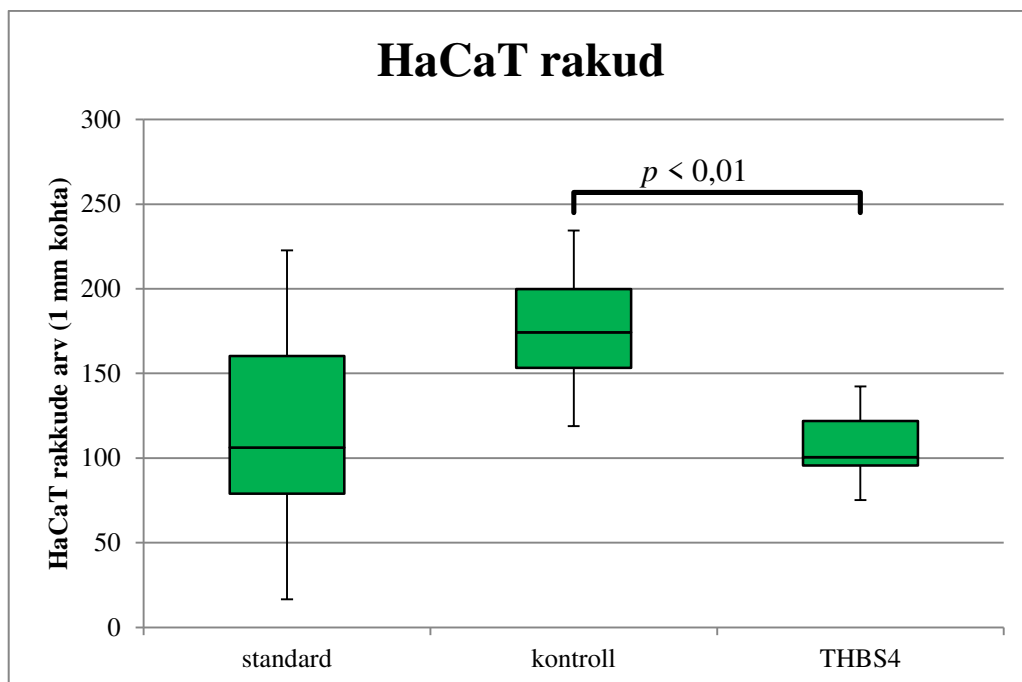
THBS4-söötme vastu. Kolmas osa rakke kasvatati edasi söötmes A (standard) ja rakke kasvatati edasi 6 päeva.



Joonis 18. Western blot, mis näitab, et THBS4 puudub tühja ekspressioonivektoriga transfecteeritud H1299 rakkudes. THBS4 sünteesitakse THBS4 geeni sisaldava ekspressioonivektoriga transfecteeritud H1299 rakkudes.

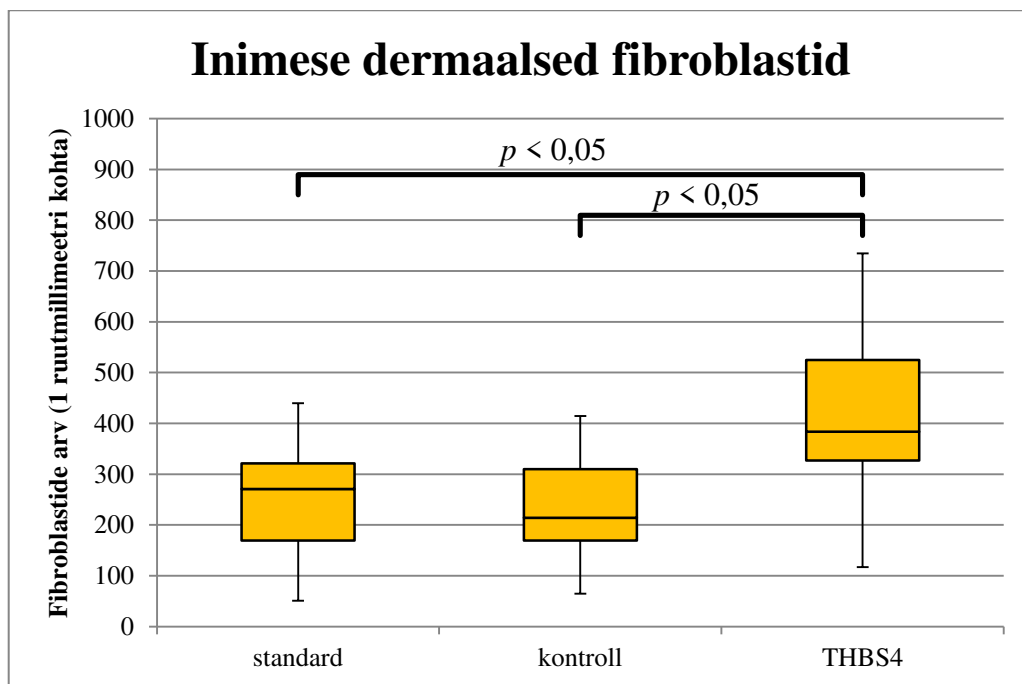


Joonis 19. (a) ja (b) söötmes A kasvatatud rakud, (c) ja (d) kontroll-söötmes kasvatatud rakud ning (e) ja (f) THBS4 sisaldavas söötmes kasvatatud rakud. (a), (c) ja (e) HaCaT rakud inimese detsellulariseeritud naha fragmentidel. DNA (sinine), tüüp I kollageen (punane) ja K5 (roheline). (b), (d) ja (f) Inimese dermaalsed fibroblastid inimese detsellulariseeritud naha fragmentides. DNA (sinine), tüüp I kollageen (punane) ja vimentiin (roheline). Mõõtlõik 20 µm.



Joonis 20. HaCaT rakkude arv 1 mm detsellulariseeritud naha fragmendi kohta.

Veapiirid näitavad standardhälvet, kasti ülemine külg näitab kolmanda kvartiili piiri, alumine külk näitab esimese kvartiili piiri, joon kastis näitab mediaani. Sööde A – ainult söötmes A kasvatatud rakud, kontroll-sööde – rakud mis on kasvatatud söötmes H1299 rakkudelt transfecteeritud tühja plasmiidiga, THBS4 – trombospondiin 4 konditsioneeritud söötmes kasvatatud rakud. Joonisel on toodud 3 sõltumatu katse tulemused, igast fragmendist on mõõdetud 3 lõiku. Statistiliselt oluline erinevus on näidatud joonega.



Joonis 21. Inimese dermaalsete fibroblastide arv 1 mm² detsellulariseeritud naha fragmendi kohta. Veapiirid näitavad standardhälvet, kasti ülemine külg näitab kolmanda kvartiili piiri, alumine külg näitab esimese kvartiili piiri, joon kastis näitab mediaani. Sööde A – ainult söötmes A kasvatatud rakud, kontroll-sööde – rakud mis on kasvatatud söötmes H1299 rakkudel transfekteeritud tühja plasmiidiga, THBS4 – trombospondiin 4 konditsioneeritud söötmes kasvatatud rakud. Joonisel on toodud 3 sõltumatu katse tulemused, igast fragmendist on mõõdetud 3 lõiku. Statistiliselt olulised erinevused on näidatud joontega.

2.4 Arutelu

Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli luua *in vitro* rekonstrueeritud naha mudel kasutades detsellulariseeritud naha fragmente ja immortaliseerunud HaCaT keratinotsüüte ning fibroblaste. Alguses uuriti, kas HaCaT rakud ekspresseerivad integriine ja millised markerid sobivad HaCaT rakkude ja inimese dermaalsete fibroblastide eristamiseks. Immunofluorestsentsanalüüsi tulemusena selgus, et vimentiin sobib inimese dermaalsete fibroblastide markeriks (joonised 8-11) ja keratiin 5 (K5) sobib HaCaT rakkude markeriks kuna need on ekspresseeritud vaid vastavates rakkudes (joonised 4-7).

Järgmiselt kontrolliti, kas trüpsiin-Triton X-100-põhise meetodiga saab detsellulariseerida inimese ja hiire nahka. Saadud detsellulariseeritud naha fragmentide immunofluorestsentsanalüüs kinnitas, et detsellulariseerimine oli edukas (joonised 12 ja 13). Seejärel külvati detsellulariseeritud inimese ja hiire naha tükkidele immortaliseerunud keratinotsüütide liini HaCaT rakke või fibroblaste ning vaadati, millisel detsellulariseeritud

naha poolel (papillaarses või retikulaarses) rakud kasvavad kõige paremini. Selgus, et HaCaT rakud kinnituvad ühtlaselt ainult inimese papillaarsele dermisele ning teistes tingimustes moodustavad juhuslikud kolooniad (joonis 14). Inimese dermaalsed fibroblastid tungivad inimese detsellulariseeritud naha fragmendi retikulaarsesse dermisesse kõige paremini võrreldes teiste tingimustega (joonis 16). Kõik need teadmised viitavad sellele, et inimese naha fragmendi detsellulariseerimisel basaalmembraan säilib ning seega tulevikus saab seda kasutada 3D nahamudeli loomisel.

Käesolev töö plaaniti esialgu läbi viia kasutades hiire mudeli peal, kuna hiirte kasvatamine on odavam kui suurte imetajate pidamine ning teiseks hiire nahk sarnaneb ehituslikult inimese nahaga. Katsed hiire detsellulariseeritud naha fragmentidega näitasid, et HaCaT rakud ja inimese dermaalsed fibroblastid ei kohane hästi hiire nahamaatriksil (joonised 14 ja 16). Selle kõige tõenäolisem põhjus on hiire ja inimese naha valkude erinevus.

Käesoleva töö teiseks eesmärgiks oli selgitada ühe potentsiaalse regeneratsiooni soodustava RVM-i faktori trombospondiin 4 mõju rakkude migratsioonile ja adhesioonile kasutades eelnevalt loodud mudelit. Selleks kasvatati HaCaT rakke ja inimese dermaalseid fibroblaste inimese detsellulariseeritud naha fragmentidel erinevate söötmete juuresolekul. Selgus, et trombospondiin 4 aktiveerib inimese dermaalsete fibroblastide kinnitumist ja migratsiooni detsellulariseeritud nahas (joonised 19b, 19d, 19f ja 21). HaCaT rakkude puhul selget positiivset mõju THBS4-l ei olnud (joonised 19a, 19c, 19e ja 20).

Trombospondiin 4 interakteerub hästi tüüp I ja tüüp III kollageenidega kuid praktiliselt ei seonu tüüp IV kollageeniga (Narouz-Ott jt., 2000). Kuna tüüp IV kollageen on basaalmembraani koostises ning tüüp I ja tüüp III kollageenid paiknevad naha interstitsiaalses maatriksis, kus samaaegselt paiknevad ka fibroblastid, siis on tõenäoline, et trombospondiin 4 seostub eelistatult dermise selle osaga, kus asuvad fibroblastid ning avaldab seal oma positiivset mõju.

Käesolevas töös näitasin, et trombospondiin 4 lisandumine suurendab fibroblastide arvu naha interstitsiaalses maatriksis *in vitro*. Muppala jt., näitasid et *THBS4 knock-out* hiirtel paraneb nahk aeglasemalt ja angiogenees toimub aeglasemalt võrreldes metsiktüüpi hiirtega (Muppala jt., 2015). Nad tegid järelduse et naha paranemise kiirus sõltub angiogeneesist. Samas käesolevas töös näitasin, et THBS4 lisamisel fibroblastide kontsentratsioon dermaalses maatriksis suureneb, mis võib kiirendada uue maatriksi sünteesi ning selle kaudu kiirendada naha paranemist. Lisaks on näidatud, et THBS4 üleekspressioon *in vitro* inimese dermaalsetes fibroblastides pidurdab apoptoosi sellega läbi anti-apoptootilise BCL-2 valgu ekspressiooni indutseerimise (Qian jt., 2019). Seega võib THBS4 olla potentsiaalseks lisafaktoriks, mida saaks kasutada haavade ja haavandite paranemist soodustava ravi koostisosana.

KOKKUVÕTE

Naha regeneratsioon on väga oluline protsess, kuna nahk kaitseb organeid ja kudesid kahjustuste eest ning kuna nahk ise on oma massilt kehas neljas organsüsteem pärast rasvkudet, skeletti ja lihassüsteemi. Naha regeneratsiooni uurimiseks on vaja usaldusväärne ja mugav mudel. Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli luua *in vitro* rekonstrueeritud naha mudel kasutades detsellulariseeritud naha fragmente ja immortaliseerunud HaCaT keratinotsüüte ning fibroblaste, kuna naha peamised rakutüübid on keratinotsüüdid ja dermaalsed fibroblastid. Alguses uuriti, kas HaCaT rakud ekspresseerivad integriine ja millised markerid sobivad HaCaT rakkude ja inimese dermaalsete fibroblastide eristamiseks. Immunofluorestsentsanalüüsi tulemusena selgus, et vimentiin sobib inimese dermaalsete fibroblastide markeriks ja keratiin 5 sobib HaCaT rakkude markeriks kuna need on ekspresseeritud vaid vastavates rakkudes.

Kuna RVM on samuti oluline naha koostisosa, siis naha mudeli loomiseks on vaja seda rekonstrueerida. Selleks kasutati detsellulariseeritud inimese ja hiire naha fragmente. Järgmiselt kontrolliti, kas trüpsiin-Triton X-100-põhise meetodiga saab detsellulariseerida inimese ja hiire nahka. Saadud detsellulariseeritud naha fragmentide immunofluorestsentsanalüüs kinnitas, et valitud meetod sobib naha fragmentide detsellulariseerimiseks. Seejärel külvati detsellulariseeritud inimese ja hiire naha tükkidele HaCaT rakke või inimese dermaalseid fibroblaste ning vaadati, millisel detsellulariseeritud naha poolel (papillaarses või retikulaarses) rakud kasvavad kõige paremini. Selgus, et HaCaT rakud kinnituvad ühtlaselt ainult inimese papillaarsele dermisele ning teistes tingimustes moodustavad juhuslikud kolooniad. Inimese dermaalsed fibroblastid tungivad inimese detsellulariseeritud naha fragmendi retikulaarsesse dermisesse kõige paremini võrreldes teiste tingimustega. Kõik need teadmised viitavad sellele, et inimese naha fragmendi detsellulariseerimisel basaalmembraan säilib ning see tagab naha mudeli parema usaldusväärsuse.

Lõpuks selgitati, et trombospondiin 4 lisandumine suurendab fibroblastide arvu naha interstitsiaalses matriksis *in vitro*. HaCaT rakkude puhul selget positiivset mõju THBS4-l ei olnud. Kuna varasemalt on teada, et dermaalsed fibroblastid sünteesivad naha RVM-i, siis THBS4 olla potentsiaalseks lisafaktoriks, mida saaks kasutada haavade ja haavandite paranemist soodustava ravi koostisosana.

SUMMARY

Construction of a 3D skin model using decellularized skin extracellular matrix and its use in investigating the influence of tissue regeneration factor THBS4.

Evgeniy Brik.

Skin is an external coating of vertebrate animals and humans. Skin is fourth largest organ system in human body by mass. Skin functions are protection of organs and tissues, body temperature regulation. The skin has two main layers: an epidermis which consists mainly of keratinocytes and a dermis which consists mainly of fibroblasts and extracellular matrix (ECM).

ECM is an intercellular network which main function is to ensure tissue resistance to load and to regulate the behavior of cells in contact with ECM. ECM can be divided into a basal membrane and an interstitial matrix. Epithelial cells anchor to basal membrane and non-epithelial cells are located in interstitial matrix. If skin is damaged, it regenerates. Unfortunately, not all the damages can be repaired so the skin fragments must be transplanted so that the repair would be successful. Alternative is to find such factors that would help to synthesize ECM itself in sufficient quantities. The aim of this study were to create an *in vitro* reconstructed skin model and to explain the effect of thrombospondin 4 on cell migration and adhesion using a created model.

The first aim of this study was to investigate, which marker proteins are best to distinguish between immortalized HaCaT keratinocytes and human dermal fibroblasts. Based on immunofluorescence analysis it was found out that keratin 5 (K5) is best marker for HaCaT cells and vimentin is best marker for fibroblasts.

The second aim of this study was to figure out, how effectively trypsin-Triton X-100 decellularization method works on human and mouse skin samples. By using an immunofluorescence analysis, it was concluded that decellularization efficiency is very high at both human and mouse skin samples. Based on this, tissue culture experiment was performed on both human and mouse decellularized skins using HaCaT keratinocytes and human dermal fibroblasts. HaCaT keratinocytes showed the best growth on human papillary part of decellularized skin and fibroblasts showed the best growth on reticular part human decellularized skin. It was concluded that even such tiny structure as basement membrane preserves very well after decellularization procedure.

The third aim of this study was to investigate an influence of thrombospondin 4 (THBS4) on HaCaT cells and human dermal fibroblasts. Tissue culture experiment supplemented with

conditioned growth media was performed. It was found that THBS has no significant effect on HaCaT cells. However, human dermal fibroblasts showed better invasion and growth in human decellularized skin in presence of THBS4.

Previously it was shown that THBS4 knock-out mouse had impaired skin regeneration and impaired angiogenesis. Also it was shown that THBS4 overexpression in human dermal fibroblasts slows down apoptosis significantly. This work shows that THBS4 can improve dermal fibroblast invasion and growth in dermal ECM. It is speculated that THBS4 could be good factor for human skin regeneration after serious skin injuries.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Behrens, D. T., Villone, D., Koch, M., Brunner, G., Sorokin, L., Robenek, H., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P. and Hansen, U. (2012). The Epidermal Basement Membrane Is a Composite of Separate Laminin- or Collagen IV-containing Networks Connected by Aggregated Perlecan, but Not by Nidogens. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (22): 18700-18709.
2. Biswas, A., Manivannan, M. & Srinivasan, M. A. (2015). Multiscale Layered Biomechanical Model of the Pacinian Corpuscle. *IEEE Transactions on Haptics*, 8 (1): 31-42.
3. Bonod-Bidaud, C., Roulet, M., Hansen, U., Elsheikh, A., Malbouyres, M., Ricard-Blum, S., Faye, C., Vaganay, E., Rousselle, P. and Ruggiero, F. (2012). *In Vivo* Evidence for a Bridging Role of a Collagen V Subtype at the Epidermis-Dermis Interface. *Journal of Investigative Dermatology*, 132 (7): 1841-1849.
4. Borowiec, A.-S., Delcourt, P., Dewailly, E., Bidaux, G. (2013). Optimal Differentiation of In Vitro Keratinocytes Requires Multifactorial External Control. *PLOS One*, 8 (10): e77507.
5. Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N. E. (1988). Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *Journal of Cell Biology*, 106 (3): 761-771.
6. Brown, I. A. (1972). Scanning electron microscopy of human dermal fibrous tissue. *Journal of Anatomy*, 113 (2): 159-168.
7. Carter, W. G., Wayner, E. A., Bouchard, T. S. and Kaur, P. (1990). The Role of Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ in Cell-Cell and Cell-Substrate Adhesion of Human Epidermal Cells. *Journal of Cell Biology*, 110 (4): 1387-1404.
8. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-824.
9. Cauna, N. and Ross, L. L. (1960). The Fine Structure of Meissner's Touch Corpuscles of Human Fingers. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 8 (2): 467-482.
10. Cromar, G. L., Xiong, X., Chautard, E., Ricard-Blum, S. and Parkinson, J. (2012). Toward a systems level view of the ECM and related proteins: A framework for the

- systematic definition and analysis of biological systems. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 80 (6): 1522-1544.
11. Dario, P., Laschi, C., Micera, S., Vecchi, F., Zecca, M., Menciassi, A., Mazzolai, B., Carrozza, M. C. (2003). Biologically-Inspired Microfabricated Force and Position Mechano-Sensors. *Academia*: 1-20.
 12. Dickson, M. A., Hahn, W. C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J. Y., Weinberg, R. A., Louis, D. N., Li, F. P. and Rheinwald, J. G. (1999). Human Keratinocytes That Express hTERT and Also Bypass a p16^{INK4a}-Enforced Mechanism That Limits Life Span Become Immortal yet Retain Normal Growth and Differentiation Characteristics. *Molecular and Cellular Biology*, 20 (4): 1436-1447.
 13. Fitzpatrick, D. 2004. Mechanoreceptors Specialized to Recieve Tactile Information, p. 192-193. *In* Augustine, G. J., Chikaraishi, D. M., Ehlers, M. D., ... Williams, S. M., *Neuroscience*, 3rd ed., Sinauer Associates, Sunderland.
 14. Franke, W. W., Schiller, D. L., Moll, R., Winter, S., Schmid, E., Engelbrecht, I., Denk, H., Krepler, R. and Platzer, B. (1981). Diversity of Cytokeratins. Differentiation Specific Expression of Cytokeratin Polypeptides in Epithelial Cells and Tissues. *Journal of Molecular Biology*, 153: 933-959.
 15. Fuchs, E. and Green, H. (1980). Changes in Keratin Gene Expression during Terminal Differentiation of the Keratinocyte. *Cell*, 19 (4): 1033-1042.
 16. Ghetti, M., Topouzi, H., Theocharidis, G., Papa, V., Williams, G., Bondioli, E., Cenacchi, G., Connelly, J. T. and Higgins, C. A. (2018). Subpopulations of dermal fibroblasts secrete distinct extracellular matrix: implications for using skin substitutes in the clinic. *British Journal of Dermatology*, 179 (2): 381-393.
 17. Giaccone, G., Battey, J., Gazdar, A. F., Oie, H., Draoui, M. and Moody, T. W. (1992). Neuromedin B Is Present in Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, 52: 2732s-2736s.
 18. Goodpaster, T., Legesse-Miller, A., Hameed, M. R., Aisner, S. C., Randolph-Habecker, J. and Collier, H. A. (2008). An Immunohistochemical Method for Identifying Fibroblasts in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56 (4): 347-358.
 19. Gray, H. and Lewis, W. H. 1918. The Common Integument (Integumentum Commune; Skin), p. 1062-1070. *In* Gray, H. and Lewis, W. H., *Anatomy of the Human Body*, 20th ed., Lea & Febiger, Philadelphia and New York.
 20. Goldsmith, L. A. (1990). My Organ Is Bigger Than Your Organ. *Archives of Dermatology*, 126 (3): 301-302.

21. Halata, Z. and Munger, B. L. (1981). Identification of the Ruffini corpuscle in human hairy skin. *Cell and Tissue Research*, 219: 437-440.
22. Harper, R. A., Grove, G. (1979). Human Skin Fibroblasts Derived from Papillary and Reticular Dermis: Differences in Growth Potential in vitro. *Science*: 204 (4392): 526-527.
23. Hasegawa, H., Naito, I., Nakano, K., Momota, R., Nishida, K., Taguchi, T., Sado, Y., Ninomiya, Y. and Ohtsuka, A. (2007). The distributions of type IV collagen α chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages. *Archives of Histology and Cytology*, 70 (4): 255-265.
24. Haskell, H. 2016. Histology of the Skin, p. 1-8. *In* Busam, K. J. and Goldblum, J. R., *Dermatopathology*, 2nd ed., Elsevier Saunders, Philadelphia.
25. Hsia, L.-T. Ashley, N., Ouaret, D., Wang, L. M., Wilding, J. and Bodmer, W. (2016). Myofibroblasts are distinguished from activated skin fibroblasts by the expression of AOC3 and other associated markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (15): E2162-E2171.
26. Kefalides, N. A. (1971). Isolation of a collagen from basement membranes containing three identical α -chains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 45 (1): 226-234.
27. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26 (4): 239-257.
28. Klaas, M., Kangur, T., Viil, J., Mäemets-Allas, K., Minajeva, A., Vadi, K., Antsov, M., Lapidus, N., Järvekülg, M. & Jaks, V. (2016). The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Scientific Reports*, 6: 27398.
29. Koivisto, L., Larjava, K., Häkkinen, L., Uitto, V.-J., Heino, J. & Larjava, H. (1999). Different integrins mediate cell spreading, haptotaxis and lateral migration of HaCaT keratinocytes on fibronectin. *Cell Adhesion and Communication*, 7 (3): 245-257.
30. Lichtenstein, J. R., Byers, P. H., Smith, B. D. Martin, G. R. (1975). Identification of the Collagenous Proteins Synthesized by Cultured Cells from Human Skin. *Biochemistry*, 14 (8): 1589-1594.
31. McGrath, J. A., Eady, R. A. J. & Pope, F. M. 2004. Anatomy and Organization of Human Skin, p. 45-128. *In* Burns, T., Breathnach, S., Cox, N., Griffiths, C., *Rook's Textbook of Dermatology*, 7th ed., Blackwell Publishing Ltd, Oxford.

32. McKemy, D. D., Neuhausser, W. M. & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416: 52-58.
33. Mikesch, L. M., Aramadhaka, L. R., Moskaluk, C., Zigrino, P., Mauch, C., Fox, J. W. (2013). Proteomic anatomy of human skin. *Journal of Proteomics*, 84: 190-200.
34. Moll, R., Franke, W. W. and Schiller, D. L. (1982). The Catalog of Human Cytokeratins: Patterns of Expression in Normal Epithelia, Tumors and Cultured Cells. *Cell*, 31 (1): 11-24.
35. Morris, A. H., Chang, J. and Kyriakides, T. R. (2016). Inadequate Processing of Decellularized Dermal Matrix Reduces Cell Viability *In Vitro* and Increases Apoptosis and Acute Inflammation *In Vivo*. *BioResearch Open Access*, 5 (1): 177-187.
36. Morton, D. A. and Crawley, J. L. 2018. Integumentary System, p. 47-56. *In* Morton, D. A. and Crawley, J. L., *Discovering Anatomy: A Guided Examination of the Cadaver*, 1st ed., Morton Publishing, Englewood.
37. Muppala, S., Frolova, E., Xiao, R., Krukovets, I., Yoon, S., Hoppe, G., Vasanji, A., Plow, E. and Stenina-Adognravi, O. (2015). Proangiogenic Properties of Thrombospondin-4. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 35 (9): 1975-1986.
38. Narouz-Ott, L., Maurer, P., Nitsche, D. P., Smyth, N. and Paulsson, M. (2000). Thrombospondin-4 Binds Specifically to Both Collagenous and Non-collagenous Extracellular Matrix Proteins via Its C-terminal Domains. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (47): 37110-37117.
39. O'Brien, K, Bhatia, A., Tsen, F., Chen, M., Wong, A. K., Woodley, D. T., Li, W. (2014). Identification of the Critical Therapeutic Entity in Secreted Hsp90 α That Promotes Wound Healing in Newly Re-Standardized Healthy and Diebetic Pig Models. *PLOS One*, 9 (12): e113956.
40. Oltulu, P., Ince, B., Kokbudak, N., Findik, S. Kilinc, F. (2018). Measurement of epidermis, dermis and total skin thickness from six different body regions with a new ethical histometric technique. *Turkish Journal of Plastic Surgery*, 26 (2): 56-61.
41. Price, D. D. and Dubner, R. (1977). Mechanisms of first and second pain in the peripheral and central nervous systems. *The Journal of Investigative Dermatology*, 69 (1): 167-171.
42. Qian, W., Zhu, W.-H., Chen, Y.-J., Fan, J.-F. (2019). Role of thrombospondin-4 in fibroblasts from normal skin and hypertrophic scars. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 12 (1): 1253-1260.

43. Reijnders, C. M. A., van Lier, A., Roffel, S., Kramer, D., Scheper, R. J. and Gibbs, S. (2015). Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent *In Vitro* Model Derived from TERT-Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue Engineering Part A*, 21: 2448-2459.
44. Reintam, M.-A. 2012. Naha ehitus, p. 615. *In* Mesila, I., Jõeste, E., Reintam, M.-A., Tamm, H., Riispere, Ž., Murde, M., Roosipuu, R., *Patoanatomia*, 1st ed., Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu.
45. Roshan, A., Murai, K., Fowler, J., Simons, B. D., Nikolaidou-Neokosmidou, V. and Jones, P. (2016). Human Keratinocytes have two interconvertible modes of proliferation. *Nature Cell Biology*, 18 (2): 145-156.
46. Robertshaw, D. (1977). Neuroendocrine control of sweat glands. *The Journal of Investigative Dermatology*, 69: 121-129.
47. Salmon, J. K., Armstrong, C. A. and Ansel, J. C. (1994). The skin as an immune organ. *Western Journal of Medicine*, 160 (2): 146-152.
48. Sandby-Møller, J., Poulsen, T. and Wulf, H. C. (2003). Epidermal Thickness at Different Body Sites: Relationship to Age, Gender, Pigmentation, Blood Content, Skin Type and Smoking Habits. *Acta Dermato-Venereologica*, 83 (6): 410-413.
49. Schoop, V. M., Mirancea, N. and Fusenig, N. E. (1999). Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 112 (3): 343-353.
50. Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., ... Wright, M. W. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal of Cell Biology*, 174 (2): 169-174.
51. Sercu, S., Zhang, M., Oyama, N., Hansen, U., El Ghalbzouri, A., Jun, G., Geentjens, K., Zhang L. and Merregaert, J. H. (2008). Interaction of Extracellular Matrix Protein 1 with Extracellular Matrix Components: ECM1 Is a Basement Membrane Protein of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 128 (6): 1397-1408.
52. Singer, A. J. and Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*, 341 (10): 738-746.
53. Sokolov, B. P., Sher, B. M. and Kalinin, V. N. (1989). Modified Method for Peptide Mapping of Collagen Chains Using Cyanogen Bromide-Cleavage of Protein within Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 176 (2): 365-367.
54. Sonnenberg, A., Calafat, J., Janssen, H., Daams, H., van der Raaij-Helmer, L. M. H., Falcioni, R., Kennel, S. J., Aplin, J. D., Baker, J., Loizidou, M. and Garrod, D. (1991). Integrin $\alpha 6 \beta 4$ Complex is Located in Hemidesmosomes, Suggesting a Major Role in

- Epidermal Cell-Basement Membrane Adhesion. *Journal of Cell Biology*, 113 (4): 907-917.
55. Sottile, J. and Hocking, D. C. (2002). Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions. *Molecular Biology of the Cell*, 13 (10): 3546-3559.
 56. Stepp, M. A., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A. Elwell, J. and Gipson, I. K. (1990). $\alpha 6\beta 4$ integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (22): 8970-8974.
 57. Sykes, B., Puddle, B., Francis, M. and Smith, R. (1976). The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 72 (4): 1472-1480.
 58. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97: 4-27.
 59. Tiedemann, K., Sasaki, T., Gustafsson, E., Göhring, W., Bätge, B., Notbohm, H., Timpl, R., Wedel, T., Schlötzer-Schrehardt, U. and Reinhardt, D. P. (2005). Microfibrils at Basement Membrane Zones Interact with Perlecan via Fibrillin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (12): 11404-11412.
 60. Tracy, L. E., Minasian, R. A. and Caterson, E. J. (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Advances in wound care*, 5 (3): 119-136.
 61. Watt, F. M. (2014). Mammalian skin cell biology: At the interface between laboratory and clinic. *Science*, 346 (6212): 937-940.
 62. Wei, J. C. J., Edwards, G. A., Martin, D. J., Huang, H., Crichton, M., L. & Kendall, M. A. F. (2017). Allometric scaling of skin thickness, elasticity, viscoelasticity to mass for micro-medical device translation: from mice, rats, rabbits, pigs to humans. *Scientific Reports*, 7 (1): 15885.
 63. Weinstein, G. D. and Boucek, R. J. (1960). Collagen and elastin of human dermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 35: 227-229.
 64. Zomer, H. D., Trentin, A. G. (2018). Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of Dermatological Science*, 90 (1): 3-12.

LIHTLITSENS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Evgeniy Brik,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose 3D nahamudeli loomine kasutades detsellulariseeritud naha rakuvälist maatriksit ning selle kasutamine koe taastumist reguleeriva faktori THBS4 mõju uurimiseks,

mille juhendajad on Viljar Jaks ja Mariliis Klaas,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Evgeniy Brik
30.05.2019